



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Dayane Alvarinho de Oliveira

**Desenvolvimento da tricuriase experimental em camundongos C57BL/6 em
fase aguda e crônica**

Rio de Janeiro

2023

Dayane Alvarinho de Oliveira

Desenvolvimento da tricuriase experimental em camundongos C57BL/6 em fase aguda e crônica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Dayane Alvarinho de.
Desenvolvimento da tricuriase experimental em camundongos C57BL/6 em fase aguda e crônica / Dayane Alvarinho de Oliveira. – 2023.
98 f.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Tricuríase – Diagnóstico. 2. Translocação bacteriana – Teses. 3. Microbioma gastrointestinal – Teses. 4. Baço – Fisiopatologia – Teses. I. Torres, Eduardo José Lopes. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 595.132

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Dayane Alvarinho de Oliveira

Desenvolvimento da tricuriase experimental em camundongos C57BL/6 em fase aguda e crônica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de setembro de 2023.

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Lilian Lacerda Bueno
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Alba Cristina Miranda de Barros Alencar
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os estudantes de graduação e pós graduação que passam por diversos obstáculos no desenvolvimento do seu projeto de pesquisa, medos interiores, ansiedades e frustrações, principalmente quando um experimento não sai como o esperado. Dedico aqueles que têm vontade de largar tudo no meio do caminho, mas que no fundo, alguma voz interior diz: calma, respira que no final vai dar certo. Aqueles que além das dificuldades “normais”, enfrentaram uma pandemia onde tudo era incerto, mas mesmo assim não desistiram. Dedico também aos amigos, familiares e orientadores que souberam dar apoio e incentivo a esses estudantes durante todo o processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois foi a quem eu recorria durante os momentos de aflição, e sempre encontrei por meio das orações uma paz interior e força pra continuar. Agradeço a minha família, meus avós: José e Maria de Fátima, e principalmente aos meus pais: Armando e Conceição, e meu irmão, Everton, que sempre me ouviram com toda paciência, mesmo sem compreender muito, quando eu explicava sobre um experimento novo e me davam ânimo e incentivo para continuar.

Agradeço aos meus amigos de dentro e de fora do laboratório, os quais não vou citar nomes para não correr a gafe por esquecer de algum, mas que ao lerem esses agradecimentos vão saber quem são, que me incentivaram e compreenderam as vezes que eu não podia participar de alguma confraternização por conta das atividades relacionadas a pós. Aos amigos que fiz no laboratório, em especial, aqueles que me ajudaram nos experimentos mesmo sem ter nada relacionado aos seus trabalhos ou projetos de pesquisa, que faziam piada, rimos juntos durante as atividades, e tornavam mais leve os obstáculos encontrados no caminho, aqueles amigos que estão comigo desde a iniciação científica.

Agradeço aos técnicos que sempre foram atenciosos e me davam suporte nos preparos das soluções e execuções de algumas técnicas. Aos técnicos e amigos que além do suporte na parte experimental ofereciam ombro amigo e me aguentavam e me faziam rir mesmo quando eu estava de mal humor ou chateada por conta de algo que não saiu como o esperado.

Agradeço a Carla, secretária da pós, que mesmo por algumas vezes eu fugindo dela quando vinha me cobrar algum prazo, sempre respondia minhas mensagens quase que instantaneamente mesmo estando de férias esclarecendo as minhas dúvidas.

Agradeço a todos os professores que disponibilizaram espaço em seus laboratórios e tempo para me auxiliar no esclarecimento de algumas dúvidas. Aos que se disponibilizaram para ler e contribuir com seus conhecimentos para elaboração desta tese. Aos que me acompanham desde que ingressei na linha de pesquisa. Agradeço em especial ao professor que além de meu orientador é um grande amigo, Eduardo Torres, que vem me acompanhando e me orientando desde a iniciação científica. Agradeço por todas, dicas e instruções de como prosseguir em determinadas ocasiões, agradeço por todos os puxões de orelha e cobrança de prazos, pois foram esses detalhes que me ajudaram a amadurecer e me tornar a profissional que sou hoje, agradeço por toda paciência, disponibilidade e compreensão, pois mesmo em meio a inúmeras atividades sempre tem um tempo para me ouvir e orientar.

O que você sabe não tem valor algum; o valor está no que você faz com o que sabe.

Bruce Lee

RESUMO

OLIVEIRA, Dayane Alvarinho. **Desenvolvimento da tricuriase experimental em camundongos C57BL/6 em fase aguda e crônica**. 2023. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A tricuriase é uma geo-helmintíase, causada pelo parasito do gênero *Trichuris*. É uma doença negligenciada que acomete principalmente moradores de países com precárias condições de saneamento básico. A sintomatologia está associada a carga parasitária, existem espécies conhecidas por causarem infecções em humanos e outros animais. A espécie *Trichuris trichiura* é conhecida por causar a tricuriase humana, e há evidências do risco da transmissão desta parasitose de animais para humanos e vice-versa. Durante o ciclo de vida deste parasito, como estratégia de sobrevivência, o mesmo se insere no epitélio intestinal do hospedeiro, causando rompimento deste tecido conforme vai se desenvolvendo e sofrendo suas mudas. Em fase crônica já foi demonstrado que ocorre hiperplasia e hipertrofia das camadas da mucosa, submucosa e camada muscular no intestino do hospedeiro, com alteração no perfil hematológico e imunológico do hospedeiro. Além disso, nosso grupo já mostrou que em fase crônica ocorre desequilíbrio da microbiota intestinal e translocação bacteriana na submucosa intestinal dos camundongos infectados. Com intuito de acompanhar e descrever em que momento as alterações começam a se tornar evidentes, analisamos a infecção de camundongos C57BL/6 em diferentes momentos (90 minutos, 10, 17, 22 e 35 dias) de acordo com as mudas da larva. Para isso realizamos infecção experimental com o modelo *T. muris*, pesagens e aferição da temperatura dos animais, distensão sanguínea, quantificação de macrófagos peritoneais, dosagens de citocinas dos macrófagos peritoneais, do ceco e dos linfonodos mesentéricos, e as análises histopatológicas do ceco e baço. Observamos que dependendo do parâmetro analisado, as alterações podem começar a ser evidentes a partir do 10º dia de infecção, como no caso da morfometria e morfologia. Ocorre uma variação nos parâmetros sanguíneos e na resposta imunológica, principalmente entre o 17º e 35º dia de infecção. Alterações em órgãos secundários, como o baço podem ser notada na tricuriase, além disso, a carga parasitária pode estar relacionada a algumas alterações não terem sido tão aparentes neste modelo estudado.

Palavras-chave: Tricuriase; Translocação bacteriana; Fase aguda; Alterações sistêmicas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Dayane Alvarinho. *Development of experimental trichuriasis in C57BL/6 mice in acute and chronic phase*. 2023. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The trichuriasis is a geohelminthiasis, caused by the parasite of the genus *Trichuris*. It is a neglected disease that mainly affects residents of countries with precarious basic sanitation conditions. The symptomatology is associated with parasitic load, there are species known to cause infections in humans and other animals. The species *Trichuris trichiura* is known to cause human trichuriasis, and there is evidence of the risk of transmission of this parasite from animals to humans and vice versa. During the life cycle of this parasite, as a survival strategy, it inserts itself into the intestinal epithelium of the host, causing disruption of this tissue as it develops and undergoes its molts. In the chronic phase, hyperplasia, and hypertrophy of the layers of the mucosa, submucosa and muscular layer of the host's intestine have already been demonstrated, with changes in the hematological and immunological profile of the host. In addition, our group has already shown that in the chronic phase there is an imbalance of the intestinal microbiota and bacterial translocation in the intestinal submucosa of infected mice. In order to follow up and describe when the changes start to become evident, we analyzed the infection of C57BL/6 mice at different times (90 minutes, 10, 17, 22 and 35 days) according to the larval seedlings. For this, we performed experimental infection with the *T. muris* model, weighing and measuring the temperature of the animals, blood distension, quantification of peritoneal macrophages, immunological measurements of peritoneal macrophages, cecum and mesenteric lymph nodes, and histopathological analysis of the cecum and spleen. We observed that depending on the parameter analyzed, changes may start to be evident from the 10th day of infection, as in the case of morphology and morphology. There is a variation in blood parameters and in the immune response, mainly between the 17th and 35th day of infection. Changes in secondary organs, such as the spleen, can be noticed in trichuriasis, and the parasite load may be related to some changes that were not so evident in this model studied.

Keywords: Trichuriasis; bacterial translocation; Acute phase; Systemic changes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição Mundial das geo-helminthíases	15
Figura 2 -	Ciclo biológico do <i>Trichuris muris</i>	19
Figura 3 -	Gavagem para a infecção experimental	26
Figura 4 -	Esquema demonstrando área onde deve ser feita a contagem diferencial dos leucócitos	29
Figura 5 -	Área destacada utilizada para a contagem de Macrófago na câmara de Neubauer	31
Figura 6 -	Baço com uma das extremidades alteradas no grupo infectado	45
Figura 7 -	Histologia do baço mostrando a poupa branca	47
Figura 8 -	Histologia do baço mostrando os megacariócitos	49
Figura 9 -	Prevalência das células observadas nas distensões sanguíneas	52
Figura 10 -	Morfometria e morfologia do ceco com 90 minutos, 10 e 17 dias	58
Figura 11 -	Morfometria e morfologia do ceco com 22 e 35 dias	59
Figura 12 -	Quantificação de células caliciformes e dos enterócitos	63
Figura 13 -	Citocinas de perfil Th1 presentes no ceco e linfonodo, ao longo da infecção..	65
Figura 14 -	Citocinas de perfil Th2 presentes no ceco e linfonodo ao longo da infecção...	67
Figura 15 -	MEV do ceco com o <i>Trichuris muris</i> rompendo a mucosa intestinal com 10 dias de infecção	69
Figura 16 -	MEV do ceco com o <i>Trichuris muris</i> rompendo a mucosa intestinal com 17 dias de infecção e bactérias aderidas	71
Figura 17 -	MEV do ceco com o <i>Trichuris muris</i> rompendo a mucosa intestinal com 17 dias de infecção, momentos antes de penetrar na mucosa	72
Figura 18 -	MEV do ceco com o <i>Trichuris muris</i> rompendo a mucosa intestinal com 22 dias de infecção e bactérias invadindo a submucosa	74
Figura 19 -	FISH	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Temperatura dos animais (°C)	43
Gráfico 2 -	Peso corpóreo dos animais (g)	44
Gráfico 3 -	Tamanho do baço (mm)	48
Gráfico 4 -	Contagem de macrófago peritoneal e citocina do sobrenadante desses macrófagos	54
Gráfico 5 -	Dosagem óxido nítrico dos macrófagos peritoneais	56
Gráfico 6 -	Peso do ceco (g) sem fezes e relação da quantidade de fezes no ceco	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados do baço ao longo da infecção	50
Tabela 2 -	Prevalência das células observadas nas distensões sanguíneas	53
Tabela 3 -	Análise morfológica da mucosa intestinal	61
Tabela 4 -	Análise morfológica da submucosa intestinal	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAMs	Macrófagos ativados alternativamente
CAMs	Moléculas de Adesão Celular
CEUA	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
Desv. Pad	Desvio Padrão
DO	Concentração da dosagem de Óxido Nítrico
d.p.i.	Dias pós infecção
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
HE	Coloração de Hematoxilina e Eosina
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
iNOS	Proteína Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Coloração <i>Periodic acid-reactive Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio Memorial Institute Roswell Park)
SFB	Soro Fetal Bovino
TDS	Síndrome da Disenteria de <i>Trichuris</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
g	Gramas
μl	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
cm	Centímetros
rpm	Rotações por minuto
°C	Grau Celsius
pg	Picograma
dl	Decilitro
x G	Força G da centrifugação

SUMÁRIO

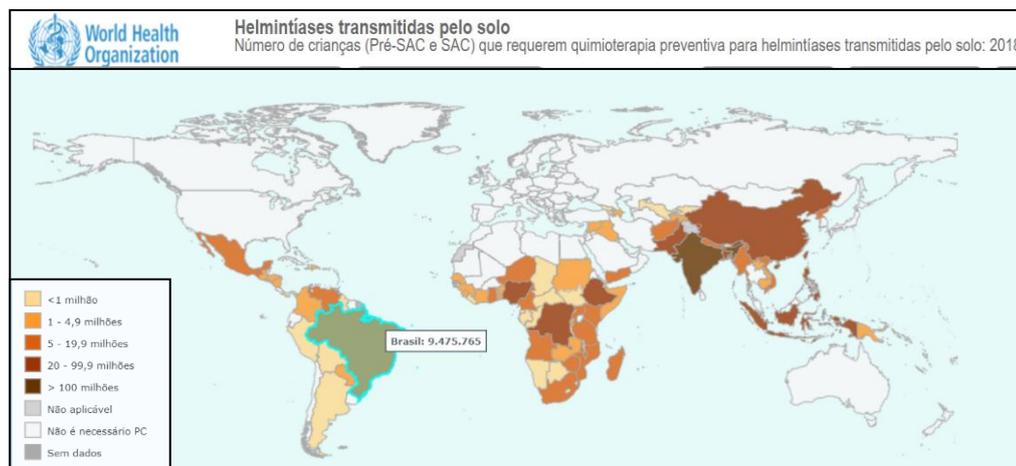
	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	23
1.1	Objetivo geral	23
1.2	Objetivos específicos	23
2	MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1	Infecção experimental	24
2.2	Temperatura dos animais (°C)	26
2.3	Pesagem (g)	26
2.3.1	<u>Peso corporal dos animais</u>	27
2.3.2	<u>Pesagem dos órgãos</u>	27
2.4	Análise sanguínea	28
2.4.1	<u>Contagem específica de leucócitos</u>	28
2.5	Obtenção das amostras para a dosagem das citocinas por citometria de fluxo	29
2.5.1	<u>Macerado dos linfonodos mesentéricos e obtenção do sobrenadante</u>	29
2.5.2	<u>Macerado do ceco e obtenção do sobrenadante</u>	30
2.5.3	<u>Contagem e plaqueamento dos macrófagos peritoneais e obtenção do sobrenadante</u>	30
2.6	Dosagens das citocinas por citometria de fluxo	32
2.7	Dosagem de Nitrito (Inos) dos Macrófagos Peritoneais	32
2.8	Processamento histopatológico	34
2.8.1	<u>Histologia do Baço</u>	34
2.8.2	<u>Histologia do ceco</u>	35
2.9	Coloração histopatológica	36
2.9.1	<u>Coloração do baço</u>	36
2.9.2	<u>Coloração do ceco</u>	36
2.10	Análise Morfométrica	38
2.10.1	<u>Morfometria do baço: Tamanho do baço e da poupa branca</u>	38
2.10.2	<u>Morfometria do ceco</u>	38
2.11	Análise Morfológica	39
2.11.1	<u>Quantificação de megacariócitos do baço</u>	39

2.11.2	<u>Morfologia do ceco</u>	39
2.11.3	<u>Contagem de células caliciformes e enterócitos</u>	39
2.12	Microscopia Eletrônica de Varredura do ceco	40
2.13	FISH do Ceco	41
2.14	Análises estatísticas	42
3	RESULTADOS	43
3.1	Temperatura dos animais (°C)	43
3.2	Pesagem dos animais (g)	44
3.3	Análises do baço	45
3.3.1	<u>Peso do baço</u>	45
3.3.2	<u>Morfometria do baço: Tamanho do baço e da polpa branca</u>	46
3.3.3	<u>Quantificação de megacariócitos</u>	48
3.4	Análise sanguínea	51
3.4.1	<u>Contagem específica de leucócitos</u>	51
3.5	Análise dos Macrófagos Peritoneais e dosagem de citocinas	54
3.5.1	<u>Contagem de macrófago peritoneal</u>	54
3.5.2	<u>Dosagem de citocinas dos macrófagos peritoneais</u>	55
3.5.3	<u>Dosagem de Óxido Nítrico dos Macrófagos</u>	55
3.6	Análise do Ceco	56
3.6.1	<u>Peso do ceco sem fezes e a relação da quantidade de fezes no ceco</u>	56
3.6.2	<u>Morfometria do ceco</u>	57
3.6.3	<u>Morfologia do ceco</u>	60
3.6.4	<u>Quantificação de células caliciformes e enterócitos</u>	63
3.7	Dosagens de citocinas	64
3.7.1	<u>Dosagem de citocinas do ceco</u>	64
3.8	Ultraestrutura da colonização <i>T. muris</i> no tecido hospedeiro	68
3.9	Mapeamento do processo de translocação por hibridização <i>in situ</i>	75
4	DISCUSSÃO	77
	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO A - Aprovação da comissão de ética	98

INTRODUÇÃO

Infecções em humanos provocadas por helmintos, principalmente geo-helmintos, infectam em sua maioria escolares e podem ter impactos no desenvolvimento físico-cognitivo, acarretando em prejuízo sócio econômico (OMS, 2020). Devido às precárias condições de saneamento básico, as geo-helmintíases atingem principalmente os países em desenvolvimento. Estima-se que 1,5 bilhão de pessoas, o equivalente a 24% da população mundial, estejam infectadas por helmintos (OMS, 2020), figura 1, onde a tricuriase humana infecta cerca de 460 milhões de pessoas (OPAS, 2018). Apesar da relevância a nível global, a tricuriase e outras parasitoses ainda são enquadradas no ranking das doenças negligenciadas (HOTEZ, BRINDLEY, *et al.*, 2008; OMS, 2017; OMS, 2022).

Figura 1 – Distribuição Mundial das geo-helmintíases



Legenda: Mapa disponibilizado pela OMS mostrando a distribuição mundial das geo-helmintíases.

Fonte: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sth/sth.html

Sabe-se que nematoides de vida livre e geo-helmintos necessitam de condições ambientais adequadas para o desenvolvimento de parte do seu ciclo biológico, tais como: umidade, pH e temperatura (CHOI, ZHOU, *et al.*, 2020). A alta pluviosidade e temperaturas em torno de 26 °C aumentam as taxas de infecção por *Trichuris trichiura* (SCHOLTE, SCHUR, *et al.*, 2013).

A espécie conhecida por causar infecção em humanos é a *Trichuris trichiura* que foi descrita por Linnaeus em 1771, porém existem outras espécies deste gênero conhecidas por

causarem infecções em outros animais, impactando a medicina veterinária, como a tricuriase em cães (*Trichuris vulpis* Froelich, 1789), suínos (*Trichuris suis* Schrank, 1788), bovinos e caprinos (*Trichuris ovis* Abildgaard, 1795) e camundongos (*Trichuris muris* Schrank, 1788), além de outras espécies descritas parasitando animais silvestres. Existem trabalhos que mostram também o risco de um hospedeiro não comum acabar servindo de reservatório ou se infectando por outra espécie de *Trichuris*, como é o caso dos macacos verdes africanos (AGM, *Chlorocebus aethiops sabaues*) em St. Kitts, nas Índias Ocidentais, que por meio de uma análise molecular apresentaram o gene trichiura-18S rRNA, confirmando os AGM como reservatório da espécie *Trichuris trichiura* (YAO, WALKUSH, *et al.*, 2018), e o trabalho que mostrou, também por meio da confirmação molecular, o caso de humanos infectados com *T. suis* na República Democrática do Laos, Mianmar e no nordeste da Tailândia (PHOSUK, SANPOOL, *et al.*, 2018), o que evidencia o risco da transmissão desta parasitose de animais para humanos e vice-versa.

Em camundongos a espécie *Trichuris muris*, descrita por Schrank em 1788, tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para estudar os impactos da tricuriase na saúde humana e veterinária (FAHMY, 1954; BEER, 1976 e KOYAMA, ITO, 2000). A tricuriase humana na maioria dos casos apresenta sintomatologia inespecífica, geralmente com baixa gravidade, porém o risco pode aumentar em relação à carga parasitária e aspectos imunológicos do hospedeiro. Dentre os quadros clínicos que podem ser apresentados, estão: náuseas, cansaço, flatulência, distensão e dor abdominal, perda de apetite, perda de peso, diarreia mucoide e sangramento intestinal (KYUNG-SUN *et al.*, 2009).

Apesar de algumas doenças infecto-parasitárias terem como características iniciais a elevação da temperatura corporal indicando a presença de alguma doença subjacente (BOISIER, JAMBOU, *et al.*, 2002; GARCIA-ZAPATA, SOUZA JÚNIOR, 2006; LOMBARD, BASSET, *et al.*, 2018), pouco se sabe sobre a temperatura corporal de um indivíduo com tricuriase. A temperatura corporal do hospedeiro também pode interferir nas infecções como uma forma de neutralizar uma possível ameaça ao organismo (BECKER, WU, 2010). Algumas infecções parasitárias podem gerar o aumento da temperatura corporal do hospedeiro, denominado febre, como no caso de algumas infecções causadas por protozoários: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*; nematoides: *Ascaris lumbricoides*; e trematóide: *Fasciola hepática* e *Schistosoma mansoni* (EKPANYAPONG, REDDY, 2020). Além disso já é sabido que na fase crônica da tricuriase ocorre invasão tecidual por bactérias e reação inflamatória local e sistêmica (SCHACHTER, *et al.*, 2020), sendo tais fatores o que tornam importante analisar se corre elevação da temperatura corporal durante a

tricuriase. A diarreia, na tricuriase, pode ser desencadeada por dois fatores: primeiro compreende a atuação de uma resposta imunológica mediada por anticorpos IgE específicos associado à degranulação de mastócitos. O segundo fator é decorrente do contato de antígenos do nematoide com células intestinais do hospedeiro, estimulando a secreção de cloreto, o que também pode promover diarreia (AZIRA et. al, 2012). Em alguns casos da doença os indivíduos podem apresentar desnutrição proteica e anemia ferropriva. Além disso, em casos graves o hospedeiro pode evoluir para a Síndrome da Disenteria de *Trichuris* (TDS), que é uma combinação de sintomas, como a diarreia mucoide e sangramento ocasional (KYUNG-SUN et. al, 2009) e para o prolapso retal.

De acordo com a OMS (2019), uma das formas de minimizar morbidades severas ocasionadas por essa e outras parasitoses, seria preconizando o uso de anti-helmínticos como quimioterapia preventiva. Porém os anti-helmínticos disponíveis no mercado só tem atuação caso o indivíduo já esteja parasitado, não tendo efeito acumulativo ou preventivo (KOGIEN et. al, 2011), e algumas pessoas que tomam essas medicações podem apresentar reações adversas (GALHARDO-DEMARCHI, MIORANZA, et al., 2009). Além disso, o tratamento com o anti-helmíntico mebendazol sem um diagnóstico preciso e concentração adequada à carga parasitária, pode interferir na morfologia do ovo de *Trichuris*, prejudicando na identificação da espécie do parasito (NEJSUM, ANDERSEN, et al., 2020). Outros estudos mostram que o uso contínuo de anti-helmínticos pode aumentar manifestações alérgicas em algumas pessoas (ENDARA et al., 2010).

Um estudo feito com animais de cativeiro no zoológico do Rio de Janeiro mostrou que 63,8% das amostras fecais coletadas deram positivas para algum tipo de parasito e 6,1% dessas amostras deram positivas para *Trichuris* sp. (BARBOSA, PINHEIRO, et al., 2019). Tanto animais de cativeiro quanto em rebanhos de criação podem se infectar, porém o uso contínuo de anti-helmínticos aumenta o surgimento de resistência por alguns nematoides aos fármacos mais usuais (SCZESNY-MORAES et.al, 2010). Para o controle das parasitoses intestinais não basta administrar anti-helmínticos de forma aleatória, deve-se compreender melhor como ocorre todo processo de infecção, o desenvolvimento da doença, carga parasitária e avaliar as características ecológicas/ambientais do parasito e hospedeiro, para assim evitar a evolução e disseminação do parasitismo.

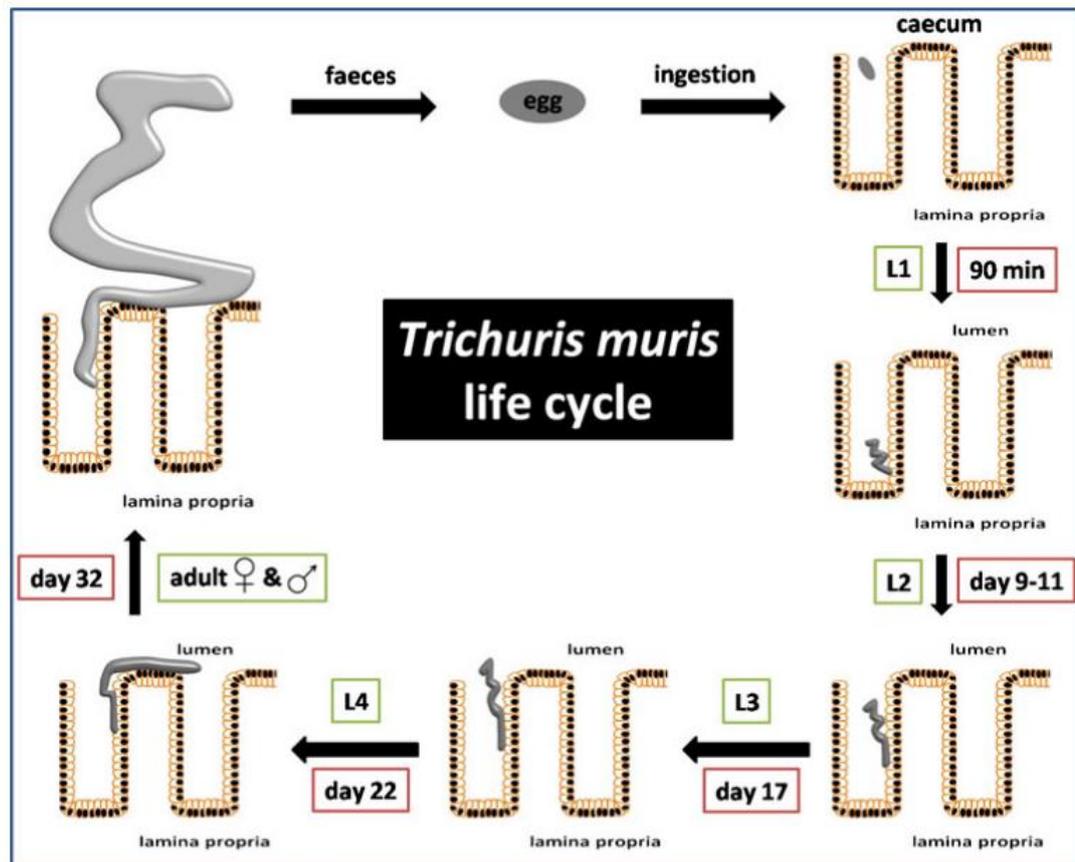
Algumas linhagens de camundongos são resistente a infecção por *Trichuris*, como as que apresentam ausência de receptores: WSX-1 KO, CCL11/IL-5 duplo KO, RELM β KO; enquanto outras linhagens são conhecidas por serem suscetíveis: BALB/c (IL-4 KO), AKR, Nude (Camundongos atímicos), dentre outras. Existem também linhagens de camundongos que

são dose dependente, ou seja, são suscetíveis dependendo da carga parasitária, é o que acontecem com os camundongos BALB/k, BALB/c, C57BL/6 dentre outros (KLEMENTOWICZ et.al, 2012). Camundongos C57BL/6 quando infectados com até 50 ovos embrionados de *T.muris*, são suscetíveis a infecção, porém quando infectados com doses acima eliminam o parasito antes mesmo de se estabelecer a infecção (BANCROFT, A J et al., 2001). É possível infectar camundongos Swiss com uma alta carga parasitária, porém por não ser uma linhagem isogênica alguns se infectam e outros não, tendo que se estabelecer um protocolo com imunomodulador nos estágios iniciais do parasitismo, para que se obtenha sucesso na infecção, o que inviabiliza estudos imunológicos na fase aguda da infecção.

O *Trichuris* é um nematoide, que não possui estrutura de fixação, como dentes, lábios desenvolvidos ou ventosas, por este motivo, e também como estratégia de sobrevivência, quando adulto ele mantém a parte anterior afilada, que correspondendo a 2/3 de seu corpo, inserida na mucosa intestinal do hospedeiro. A superfície da região anterior, mas especificamente a face ventrolateral do corpo deste parasito, é provida de aproximadamente 50 mil glândulas que se abrem em poros cuticulares que podem liberar substâncias com características imunomodulatórias (LOPES TORRES et.al, 2013; SCHACHTER et al., 2019; LOPES-TORRES et al., 2020). A parte posterior, mais robusta, fica em contato com a luz intestinal, que é onde estão localizados os órgãos reprodutores, facilitando o encontro e a fecundação da fêmea com o macho (LOPES TORRES et.al, 2013).

Além da larva e do produto de excreção/secreção liberados pela mesma (PARTHASARATHY, MANSFIELD, 2005; LEROUX, NASR, et al., 2018), o ovo do *Trichuris* também possui características antigênicas e imunomodulatórias servindo como estímulo primário para o sistema imunológico do hospedeiro. Um trabalho de proteômica com ovo não embrionado de *Trichuris trichiura* mostrou que na composição do ovo deste parasito existem proteínas específicas que desempenham funções no metabolismo do parasito, composição estrutural do citoesqueleto, músculos, associadas à motilidade, proteólise, sinalização celular, na resposta à estresse, processos de desintoxicação, síntese proteica, ligação e transporte de lipídeos. Esses dados para futuros estudos de imunodiagnóstico e melhor compreensão com a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro (CRUZ, MARCILLA, et al., 2021).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Trichuris muris*



Legenda: Esquema do ciclo biológico do *Trichuris muris*. Fonte: KLEMENTOWICZ E., TRAVIS A., *et al.*, 2012.

Durante o ciclo de vida do *T. muris* em camundongos, o hospedeiro ingere os ovos embrionados contendo a larva no estágio L1 (DUQUE-CORREA, GOULDING, *et al.*, 2022). Esses ovos sofrem por ação das bactérias da microbiota intestinal, onde as *Escherichia coli* aderem nos plugs polares e por ação das fímbrias do tipo I deixam esses plugs mais fragilizados facilitando a eclosão da larva (HAYES, K. S., BANCROFT, *et al.*, 2010). Cerca de 90 minutos após a infecção, no ceco, a larva L1 eclode do ovo, degradam a camada de muco e penetram nas células epiteliais intestinais pelas bases das criptas de Lieberkühn (DUQUE-CORREA, GOULDING, *et al.*, 2022), tendo que superar barreiras como muco que cobre o epitélio, o fluxo contínuo de fluido que flui da cripta para o lúmen e a renovação das células epiteliais que ocorrem entre 3 a 5 dias (GEHART, CLEVERS, 2019; DUQUE-CORREA, GOULDING, *et al.*, 2022), rompendo a parede lateral das células epiteliais, mantendo a superfície apical e basal das células intactas, onde forma uma espécie de túnel em meio ao citoplasma dessas células (TILNEY, CONNELLY, *et al.*, 2005; KLEMENTOWICZ E., TRAVIS A., *et al.*, 2012). Após 24h da ingestão do ovo essa larva já se encontra totalmente intracelular (DUQUE-CORREA,

GOULDING, *et al.*, 2022). A presença do parasito no epitélio intestinal promove a liberação de antígenos que são captados pelas células dendríticas CD11⁺, dependentes de IRF 4, e por outras células da imunidade inata. Estas células migram para o linfonodo mesentérico onde ativam linfócitos Th2, estes por sua vez induzem os linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgG1, IgA e IgE. A larva sofre sua muda de L1 para L2 entre o 9º- 11º dia após a ingestão do ovo. Com cerca de 17 dias muda para L3, com 22 dias para L4 e com 32 dias já é possível observar machos e fêmeas sexualmente maduros. Com 35 dias de infecção começamos a identificar a eliminação de ovos junto às fezes do hospedeiro, caracterizando a fase crônica da tricuriase, figura 2 (KLEMENTOWICZ *et al.*, 2012; YOUSEFI, HAQ, *et al.*, 2021).

Nosso grupo mostrou que em fase crônica da infecção, as lesões na mucosa epitelial do ceco proporcionam translocação bacteriana da luz intestinal para submucosa. Essa invasão bacteriana associada à presença do parasito ocasiona uma reação inflamatória com migração de diversas células do sistema imune levando a um aumento na espessura das três camadas do tecido intestinal, aumento no número de células caliciformes e algumas alterações em parâmetros sanguíneos (SCHACHTER *et al.*, 2019). Além disso, sabe-se que a tricuriase causa um desequilíbrio na microbiota intestinal, interferindo principalmente na população de *Bacteróides* e *Lactobacilos* (HOLM, SOROBETEA, *et al.*, 2015; HOULDEN, HAYES, *et al.*, 2015)

Apesar do parasito secretar substâncias e estimular células que modulam a resposta a essa infecção, evitando uma reação mais agressiva e a contínua destruição do tecido intestinal, a infecção causada no intestino pela a tricuriase, em camundongos C57BL/6 APC^{min/+}, desencadeia alterações neoplásicas no intestino aumentando ainda mais a proliferação e o tamanho de células carcinogênicas nesses animais, que já possuem o gene de pré disposição tumoral APC^{min/+} (TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2004; HAYES; CLIFFE, *et al.*, 2017).

A infecção pelo parasito *T. muris* é conhecida por causar hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes (MARILLIER *et al.*, 2008; D'ELIA *et al.*, 2009; SCHACHTER *et al.*, 2019), e aumento na produção de mucina do tipo Muc2 e Muc5ac por estas células (D'ELIA, DESCHOOLMEESTER, *et al.*, 2009; YOUSEFI, HAQ, *et al.*, 2021). As células caliciformes também expressam o receptor Relm-β que desencadeia a produção de citocinas do tipo Th2, responsáveis pela eliminação do parasito. Dependendo do tipo de resposta imune induzida pelo indivíduo, é possível compreender porque dentro de uma mesma linhagem heterogênea de camundongos, alguns são resistentes e outros são suscetíveis à infecção. Quando o hospedeiro desenvolve uma resposta inicial mais inclinada ao perfil Th1, a infecção evolui para fase crônica, já os animais que desenvolvem uma resposta com perfil Th2, apresentam resistência a

infecção, eliminando o parasito (HURST, Rebecca J M, ELSE, 2013). Em infecções com baixa carga parasitária, tanto camundongos resistentes quanto suscetíveis a infecção, tendem a desenvolver a fase crônica da doença mediado por citocinas Th17 e IFN- γ , controlada por uma resposta mediada pela IL-10 (GRENCIS, HUMPHREYS, et al., 2014; LEVISON, MCLAUGHLIN, et al., 2010). As principais citocinas da resposta imune Th2 apresentadas na tricuriase são: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, produzidas em sua maioria pelas células T CD4⁺ e ILC2s. Camundongos sem expressão de IL-4 ou IL-13 são suscetíveis à infecção com *T. muris* (YOUSEFI, HAQ, et al., 2021). Esses dados só nos confirmam a importância de se estudar como evolui a resposta imunológica durante a tricuriase.

Além do ceco, que é o sítio de preferência deste parasito, nosso grupo também mostrou em fase crônica, alterações sanguíneas e imunológicas, destacando impactos sistêmicos desencadeados por esta infecção (SCHACHTER J et. al, 2019), porém pouco se conhece sobre essas alterações, não se sabe em que momento da infecção estas alterações se iniciam, se é associada apenas a presença do parasito, ou ao processo de invasão bacteriana ou com a junção destes fatores patogênicos, e se podem impactar em outros órgãos devido ao aumento da migração de células imunológicas e as citocinas liberadas.

Os linfonodos ou gânglios linfáticos, são órgãos do sistema imunológico responsáveis pela remoção de antígenos circulantes pela linfa, e é o local onde ocorre a apresentação de antígenos e ativação de células imunológicas que percorrem o corpo pelos vasos linfáticos. (WILLARD-MACK, 2006; ABBAS, 2012). Quando se tem uma infecção em um determinado ponto do organismo é normal observarmos os linfonodos mais próximos a essa infecção inchados devido ao acúmulo e ativação de células imunes. O estudo da estrutura e função dos linfonodos tem avançado nos últimos anos, sendo este órgão também utilizado para o diagnóstico precoce de câncer de colón (MILLS, 1989; MÄRKEL, 2015). Temos linfonodos espalhados por todo o corpo, em regiões como pescoço, clavícula e virilha. Conhecendo o sítio da infecção e estudar os linfonodos próximos a esta região e os órgãos envolvidos nessa defesa nos auxilia a compreender melhor como ocorre a resposta imune de determinada doença.

O baço também é um órgão de suma importância nas interações imunológicas, sendo considerado como o maior órgão linfoide, responsável pela eliminação de células velhas ou danificadas da corrente sanguínea, auxilia na ativação da resposta imune, além da eliminação de bactérias e antígenos presentes no sangue, ainda auxilia na produção de mucina do tipo MUC 15 (MEBIUS, KRAAL, 2005; LINDEN, SUTTON, et al., 2008).

Todas essas evidências nos mostram que para a prevenção, combate e melhor entendimento a respeito da fisiopatologia e interação da tricuriase, é necessário investir em

estudos que visam descrever melhor a dinâmica do parasito para traçar um perfil das alterações nos diferentes momentos desta infecção, de acordo com as mudas sofridas pela larva, desde os 90 minutos, que é quando ocorre eclosão da larva e de acordo com a literatura a inserção do parasito na mucosa, até a fase crônica, que nesta parasitose é caracterizada pela eliminação de ovos junto às fezes do hospedeiro. Além de investigar e compreender em que momento as alterações se tornam evidentes, qual o papel dos órgãos linfoides na resposta imune do hospedeiro e como se comporta o intestino ao longo do parasitismo.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Analisar os impactos da evolução da tricuriase em baixa dose (50 ovos) de infecção desde a fase aguda (90 min, 10 dias, 17 dias e 22 dias) até a crônica (35 dias), avaliando sinais fisiológicos, alterações teciduais (baço e ceco), processo de translocação bacteriana, parâmetros sanguíneos e imunológicos em camundongos C57BL/6.

1.2 Objetivos específicos

- a) Aferir sinais fisiológicos, como: temperatura corporal, pelagem e peso dos animais nos diferentes períodos da infecção;
- b) Verificar se a infecção promove alterações anatômicas e histopatológicas no baço e ceco;
- c) Analisar o impacto da infecção no perfil celular do sangue periférico ao longo da infecção por meio de distensão sanguínea;
- d) Verificar o momento do processo de translocação bacteriana da luz intestinal para a submucosa ao longo da infecção (90 min, 10, 17, 22 e 35 dias).
- e) Acompanhar o processo de resposta imune, dosando citocinas dos linfonodos mesentéricos e ceco (90 min, 10, 17, 22 e 35 dias);
- f) Avaliar a migração de células inflamatórias e o impacto sistêmico, com a contagem de macrófagos peritoneais e dosagem de citocinas e óxido nítrico liberadas por estes (90 min, 10, 17, 22 e 35 dias).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Infecção experimental

Os ovos de *T. muris* utilizados no experimento são provenientes da ovoposição de fêmeas recuperadas em infecções anteriores, da cepa *Trichuris muris* Edinburgh, fornecidos pelo Dr. Francisco Bolas (Universidad Complutense de Madrid).

Para a obtenção dos ovos de *T. muris*, durante as necrópsias anteriores o intestino/ceco dos camundongos infectados foram retirados, abertos e lavados em solução salina 0,9%, delicadamente com o auxílio de um pincel redondo, nº 02, com as pontas compostas por pelos suaves e flexíveis pincelamos até a remoção total das fezes. Posteriormente esse intestino foi colocado em uma placa de petri com mais salina, e com cuidado pincelamos os vermes devagar e sem forçar a sua resistência até que soltasse do tecido. Após triamos e separamos apenas os vermes vivos e colocamos em uma placa de 24 poços contendo meio RPMI 1640 (Cultilab[®]), gentamicina (10 mg/ml) e anfotericina (2,5µg/ml) e deixamos na estufa de CO₂ a 27°C por 1h. Após esse período passamos os vermes para um poço da placa onde continham apenas meio RPMI 1640 (Cultilab[®]) e deixamos na estufa de CO₂ a 27°C por 24h. Após esse período os vermes foram retirados e congelados no freezer -80°C para experimentos futuros. O meio que ficou no poço foi centrifugado 500 xG por 5 min. O sobrenadante foi aliqotado e filtrado para a extração de produto de excreção e secreção e congelado no freezer -80°C para experimentos futuros. O sedimento era onde se encontravam os ovos. Este foi ressuscitado e lavado em água estéril por duas vezes, repetindo o processo de centrifugação durante as lavagens. Após os ovos foram armazenados em água estéril na geladeira (4 a 8°C) até que fossem colocados para embrionar.

Para o embrionamento, os ovos foram lavados duas vezes em água desclorada e estéril, e incubados a 28 ± 2 °C por 28 dias, acompanhados semanalmente. Depois deste período, a porcentagem de ovos embrionados foi estimada por microscopia de luz.

Para os experimentos de MEV e FISH, utilizamos 10 camundongos Swiss e para os demais experimentos 75 camundongos Black (C57BL/6). Todos machos com 4 semanas de vida, proveniente do biotério central do ICTB/Fiocruz Manguinhos. Os animais ao chegarem no biotério da UERJ, foram mantidos durante uma semana em quarentena, sendo realizados

exames de fezes periódicos, a fim de descartar qualquer risco de infecção por outro parasito, principalmente *Syphacia*.

Após a quarentena, os camundongos foram divididos em dez grupos, cinco controle (sem infecção) e cinco infectados (*T. muris*), correspondentes a diferentes tempos de infecção (90 minutos, 10, 17, 22 e 35 dias). Para a infecção experimental em baixa carga parasitária, administramos 150 ovos (nos Swiss) e 50 ovos (nos C57BL/6) embrionados de *T. muris* em 0,2 mL de água estéril por gavagem e apenas água estéril nos controles, com o mesmo volume 0,2 mL (figura 3).

Uma semana após a infecção, durante três dias alternados realizamos a imunomodulação nos camundongos Swiss. Para isso, administramos 50µl de Diprospan® (dipropionato de betametasona 5mg/ml + fosfato dissodico de betametasona 2mg/ml) intramuscular em cada um dos dias, alternando a pata por dia de imunomodulação.

Utilizamos a linhagem Swiss por ser suscetível a maior carga parasitária, facilitando nas análises da translocação bacteriana. E utilizamos a linhagem C57BL/6 por não necessitar ser imunomodulado, o que nos permite as análises imunológicas nas etapas iniciais da infecção.

Para a realização dos experimentos mais invasivos, os animais foram eutanasiados em câmaras de CO₂. Todos os procedimentos foram discutidos e aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ e estão regidos sob a CEUA 059/2018.

Figura 3 - Gavagem para a infecção experimental



Legenda: Imagem mostrando como é realizada a gavagem.

Fonte: <https://www.jove.com/video/53770/utilizing-an-orally-dissolving-strip-for-pharmacological>.

2.2 Temperatura dos animais (°C)

Para aferir a temperatura dos camundongos, minutos antes de darmos início a necropsia, os animais foram imobilizados e a temperatura aferida com a utilização de um termômetro infravermelho da marca Central Brasil[®] e modelo CB-88^a (-50 a 420°C), na direção do abdome do animal mantendo uma distância aproximada de 132 mm, conforme as instruções do fabricante.

2.3 Pesagem (g)

Todas as pesagens foram realizadas utilizando a balança eletrônica analítica de precisão (Marte[®]).

2.3.1 Peso corporal dos animais

Os animais foram acomodados em um recipiente plástico transparente de 500mL e pesados ainda vivos nos dias 0 e 10, 17, 22 e 35 após a infecção e imediatamente antes das necropsias.

2.3.2 Pesagem dos órgãos

Durante a necropsia o baço foi retirado e pesado inteiro e fotografado antes de ser submetido a fixação. Para a pesagem utilizamos um pedaço de parafilm[®] como suporte na balança. Após a pesagem os baços foram colocados sobre em uma placa de vidro atrelada a uma régua e fotografados individualmente para que pudesse ser realizada a medida de seu comprimento pelo software image J 1.53K, USA. Após fotografados, os baços foram imersos em formalina tamponada em tampão fosfato 4% por no mínimo de 48hs antes das amostras serem processadas para histologia.

A fins de descartar qualquer discrepância no peso do baço devido ao fato do camundongo ser mais leve ou mais pesado, além do peso do baço em gramas, calculamos e relatamos a proporção do peso do baço em relação ao peso corporal do animal, e os dados foram expressos em porcentagem.

Também durante a necropsia, o ceco foi retirado e pesado, primeiramente com fezes e depois sem as fezes. Para as duas pesagens utilizamos um pedaço de parafilm[®] como suporte na balança. Para a pesagem sem fezes, o ceco foi aberto em uma placa de Petri de 90 x 15mm contendo salina à 0,9%, todo material fecal foi removido com o auxílio de um pincel redondo, n° 02, com as pontas compostas por pelos suaves e flexíveis, e em seguida, seco em papel toalha antes da pesagem.

Para analisar o volume de fezes retido no ceco, foi realizado um cálculo, onde retiramos o valor associado ao peso do ceco sem fezes do órgão pesado ainda com o conteúdo fecal.

$$\text{Ceco com Fezes} - \text{Ceco sem Fezes} = \text{Conteúdo Fecal}$$

(1)

2.4 Análise sanguínea

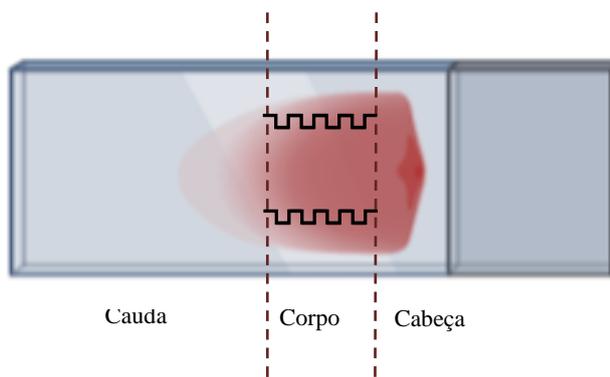
2.4.1 Contagem específica de leucócitos

Para a realização da contagem específica e diferencial dos leucócitos, foi feita a distensão sanguínea, onde uma alíquota de aproximadamente 5 μ L de sangue periférico obtido da cauda dos animais, foi adicionada sobre uma lâmina de vidro limpa e desgordurada, e distendida em um ângulo de 45°. Após a secagem, em temperatura ambiente, as células foram fixadas e coradas com o kit de coloração Panótico (Laborclin[®]).

Para a fixação e coloração as lâminas foram submersas solução nº 1 (Triarilmetano + metanol -1g/1000ml), mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixamos escorrer sem lavar; após escorrer submergimos as lâminas na solução nº 2 (Xantenos + água deionizada – 1g/1000ml), mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixamos escorrer bem, sem lavar; posteriormente submergimos as lâminas na solução nº 3 (Tiazinas + água deionizada – 1g/1000ml), mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixamos escorrer bem e secar naturalmente em temperatura ambiente.

Depois de seca, a análise quantitativa e qualitativa diferencial dos leucócitos foi realizada utilizando a microscopia de luz com objetiva de 100x em imersão no microscópio Olympus Standard modelo CX-21. Para estabelecer os parâmetros, utilizamos o método de Ameia modificado, realizando a leitura do corpo da lâmina, conforme ilustrado na figura 4, com a finalidade de compensar a má distribuição dos leucócitos entre o centro e a borda da distensão, já que os diferentes tipos de leucócitos não se distribuem uniformemente sobre a lâmina (BAIN, 2009).

Figura 4 – Esquema demonstrando área onde foi feita a contagem diferencial dos leucócitos.



Legenda: Lâmina com distensão sanguínea indicando a área e modo para a leitura e contagem das células, indicado pelo zig-zag em preto. Fonte: Adaptado de Biorender.

2.5 Obtenção das amostras para a dosagem das citocinas por citometria de fluxo

2.5.1 Macerado dos linfonodos mesentéricos e obtenção do sobrenadante

Para analisar o perfil de citocinas produzidas pelos linfonodos mesentéricos, os mesmos foram retirados e pesados para padronizar o cálculo proporcional de volume do macerado. Para a pesagem utilizamos um pedaço de parafilm® como suporte na balança. Após a pesagem foi adicionada uma gota (aproximadamente 50µl) de PBS em cada, para que os mesmos não ressecarem até que fossem levados para a cabine de fluxo laminar, e foi calculado o volume de PBS a ser adicionado para o macerado. O cálculo foi realizado de acordo com o peso do tecido em questão para chegarmos ao volume de PBS que seria adicionado durante a maceração. Para cada 0,001g de tecido foi adicionado 100µL de PBS estéril.

Na cabine de fluxo laminar, os linfonodos foram colocados em uma peneira com tela de nylon estéril, essa peneira dentro de uma placa de Petri 90x15mm, onde foi adicionado o volume de PBS calculado. Com auxílio do êmbolo de uma seringa de 5ml, o linfonodo foi macerado. O líquido resultante foi colocado em tubo de centrifugação de 1,5ml, centrifugado a 500 xG por 5 min e o sobrenadante recuperado e armazenado a -80°C até a análise das citocinas.

Com o objetivo de preservar o material e garantir maior sucesso nas análises, uma vez descongeladas, todas as amostras foram dosadas.

2.5.2 Macerado do ceco e obtenção do sobrenadante

Após a pesagem do ceco total e remoção total dos vermes, um fragmento de 8mm foi retirado com o auxílio de uma caneta de biópsia para o macerado e obtenção do material para a dosagem da citocina. O fragmento foi pesado e levado para a cabine de fluxo laminar onde foi feito o macerado, seguindo a seguinte proporção do volume de PBS estéril: a cada 0,001g de tecido foi adicionado 50 μ L de PBS. O líquido resultante foi colocado em tubo de centrifugação de 1,5ml, centrifugado a 500 xG por 5 min. O sobrenadante foi aliquoteado e mantido congelado (-80°C) até que fossem realizadas as dosagens das citocinas. Com o objetivo de preservar o material e garantir maior sucesso nas análises, uma vez descongeladas, todas as amostras foram dosadas.

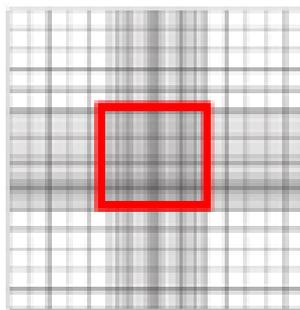
2.5.3 Contagem e plaqueamento dos macrófagos peritoneais e obtenção do sobrenadante

Para analisar a migração de macrófagos para a região peritoneal e o perfil imunológico destes macrófagos, eles foram coletados, quantificados, plaqueados e o sobrenadante recuperado após 24h de incubação.

Coletamos o lavado peritoneal antes de abrir o animal para a retirada dos órgãos. Logo após a necropsia a pele dos camundongos foi retirada com cuidado para não romper a membrana do peritônio. A superfície foi higienizada com etanol 70% e injetamos 5ml de meio RPMI 1640 (Cultilab®) refrigerado previamente a 4°C contendo gentamicina (10 mg/ml) e anfotericina (2,5 μ g/ml). Após massagear o peritônio para soltar os macrófagos aderidos à parede, este conteúdo foi coletado com o cuidado para não perfurar nenhum órgão. A seringa foi mantida sob refrigeração (4°C) para evitar a aderência dos macrófagos na parede da seringa, até que fosse levada para a cabine de fluxo laminar.

Na cabine de fluxo laminar, a agulha foi desacoplada da seringa e o conteúdo da seringa foi passado para um tubo cônico com tampa rosqueada de 15ml e estéril. Homogeneizamos o líquido com o auxílio de uma pipeta de 1000 μ l e retiramos 10 μ l da suspensão para contagem na câmara de Neubauer (figura 5).

Figura 5 - Área destacada utilizada para a contagem de Macrófago na câmara de Neubauer



Legenda: Imagem ilustrativa das zonas para contagem de células na câmara de Neubauer. Em vermelho, área utilizada para a contagem dos macrófagos peritoneais. Fonte: Adaptado de Biorender.

Para sabermos a quantidade de macrófagos que haviam no peritônio dos camundongos fizemos uma relação entre o valor quantificado com o volume de líquido recuperado, já que não conseguimos recuperar o mesmo volume em todos os camundongos.

Para plaquear os macrófagos a fins de que todos os poços tivessem a mesma quantidade de células e pudéssemos obter o sobrenadante para a dosagem das citocinas, utilizamos uma placa de 24 poços e calculamos o volume a ser adicionado em cada poço de modo que obtivéssemos uma concentração final de macrófagos equivalente à 2×10^6 . Os macrófagos foram aderindo na placa por uma hora em estufa de CO₂ à 37 ° C. Após esse período o sobrenadante foi desprezado e adicionamos meio RPMI 1640 (Cultilab[®]) + SFB (10%) + LPS (3 μ g/ml) (Sigma-Aldrich[®]) em duplicata e na outra duplicata somente RPMI 1640 (Cultilab[®]) + SFB (10%) (Sigma-Aldrich[®]), por animal. Adicionamos LPS para estimular os macrófagos ativados. Deixamos interagindo com os macrófagos durante 24hs na estufa de CO₂ à 37 ° C. Após esse período, alíquotamos o sobrenadante e congelamos no freezer -80°C até o dia das dosagens das citocinas. Com o objetivo de preservar o material e garantir maior sucesso nas análises, uma vez descongeladas, todas as amostras foram dosadas.

2.6 Dosagens das citocinas por citometria de fluxo

Para quantificar as citocinas, avaliamos os cinco diferentes momentos da infecção (90 min, 10, 17, 22 e 35 d.p.i.). Para as dosagens das citocinas do linfonodo e do ceco utilizamos o kit mouse inflammation (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70 – BD[®] Biosciences Pharmigen, CA EUA). Para as dosagens das citocinas provenientes do sobrenadante de macrófagos peritoneais utilizamos o kit Mouse Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17 e IL -10 - BD[®] Biosciences Pharmigen, CA EUA). Ambas dosagens foram realizadas usando o método CBA (Cytometric Bead Array), onde uma mistura de reagentes fluorescentes recobertos com anticorpo específico para as citocinas oferecidos pelo próprio kit foi adicionado às amostras e incubados por 2 h à temperatura ambiente com proteção da luz. Para realizar a curva padrão e o cálculo das concentrações encontradas nos testes, foram incubando microesferas do reagente Human Cytokine Standards em diferentes concentrações (0-5000 pg / mL). Após a incubação, 500 μ l de solução de lavagem foram adicionados a cada tubo e centrifugados a 200 x G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 300 μ l em solução de lavagem, fornecida pelo fabricante, e centrifugadas a 500 xG por 10 min, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente. O sedimento foi homogeneizado com 100 μ l de Wash Buffer, foram adquiridos 2500 eventos no citômetro de fluxo FACS Canto II. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa FCAP Array (BD Bioscience) e a concentração de citocinas foi determinada tendo como base a curva-padrão estabelecida, cujas concentrações mínima e máxima foram de 10 e 5000 pg/dL, respectivamente. Os resultados foram expressos em pg/ml.

2.7 Dosagem de Nitrito (iNOS) dos Macrófagos Peritoneais

Após as amostras dos sobrenadantes terem sido descongeladas e parte realizada a dosagem das citocinas, utilizamos o restante do sobrenadante para realizar a dosagem de óxido nítrico.

Para a dosagem de óxido nítrico foi preciso o preparo do reagente de Griess, onde juntamos a solução A com a solução B.

Solução A:

- Adicionamos 0,1g de N-1 Naphylethylene diamine dihydrochloride em 100ml de H₂O destilada;
- Homogeneizamos em um agitador magnético até dissolver toda a solução (sem aquecer);
- Armazenamos na geladeira a 4°C até a hora do uso.

Solução B:

- Adicionamos 1 g de P-aminobenzene-sulfinamida em 100ml de H₂O destilada com 5% de ácido fosfórico (H₃PO₄);
- Homogeneizamos em um agitador magnético até dissolver toda a solução (sem aquecer);
- Armazenamos na geladeira a 4°C até a hora do uso.

Obs.: O reagente de Griess só tem validade de três meses, então só juntamos as duas soluções (Solução A + Solução B na concentração de 1:1) na hora do uso.

Para sabermos o volume de NaNO₂ que iríamos precisar para o preparo da curva padrão, utilizamos a seguinte fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$50000 \mu\text{M de NaNO}_2 \times V_i = 500 \mu\text{M de NaNO}_2 \times 1000\mu\text{L}$$

$$V_i = 500000/50000$$

$$V_i = 10\mu\text{L}$$

$$10\mu\text{L de NaNO}_2 + 990\mu\text{L de RPMI}$$

(2)

Sendo que para a curva padrão a concentração máxima de NaNO₂ é de 500μM e a mínima é 0μM. Foram feitas diluições seriadas: 500μM (10μL de NaNO₂ + 990μL de RPMI); 250μM; 125μM; 62,5 μM; 31,25μM; 15,62 μM; 7,81μM; 3,9μM; 1,95μM e 0μM, onde foram pegos 500μL do primeiro tubo e diluído no segundo que já continha 500μl de meio RPMI 1640 (Cultilab®), e assim sucessivamente.

Foram pipetados, em triplicata na placa de Elisa de 24 poços com fundo chato, 100μL das concentrações de NaNO₂ para a curva padrão e 100 μL das amostras para as dosagens. Após, pipetamos 100μL do reagente de Griess em temperatura ambiente (Solução A + Solução B na concentração de 1:1) em cada poço. As placas foram envoltas em papel alumínio e levadas imediatamente para a leitura no aparelho de espectrofotômetro com filtro de 570nm.

Para calcular o resultado, escolhemos duas concentrações da curva de NaNO₂ (chamada de DO), no qual os valores das amostras do experimento estivessem dentro da faixa para calcular o valor de “a”.

Para a determinação do valor de “a” utilizamos a seguinte fórmula:

$$a = \frac{\text{média da maior DO} - \text{média da triplicata da menor DO}}{\text{Concentração do maior NaNO}_2 \text{ da curva} - \text{Concentração do menor NaNO}_2 \text{ da curva}} \quad (3)$$

Após determinar o valor de “a”, colocamos ele na seguinte fórmula:

$$X = \frac{y-b}{a} \quad (4)$$

Onde:

b = Valor da média da DO na concentração de 0 μM

a = inclinação da reta

y = valor da DO do experimento

Os valores de X obtidos foram utilizados para a elaboração do gráfico e análises estatísticas.

2.8 Processamento histopatológico

As amostras destinadas às análises histopatológicas foram fixadas em formalina tamponada em tampão fosfato a 4% (Merck[®]) por um período mínimo de 48h antes do processamento para histologia.

2.8.1 Histologia do Baço

O baço após retirado durante a necrópsia, foi pesado, fotografado ao lado de uma régua milimetrada com o auxílio da câmera digital de aparelho móvel (Galaxy S9, versão

10.5.03.19_medida de 4:3 4032x3024_12 MP) e fixado em formalina tamponada em tampão fosfato 4%, sendo processados para histologia após um mínimo de 48hs. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image J. Durante o processamento, o baço foi lavado em água corrente por 5 min para retirada do excesso de formol. Em seguida, foi desidratado em série alcoólica de etanol: 70%, 80%, 95% e 2X absoluto por 15 minutos em cada. As amostras foram diafanizadas em três séries de Xilol por 15 minutos cada, sendo a primeira Etanol/Xilol na proporção 1:1, e as duas seguintes apenas xilol, e infiltradas em três séries de parafina, sendo 30 minutos cada. Após o processamento, as amostras foram emblocadas em parafina histológica e cortes longitudinais laterais de 5 μ m foram obtidos com o uso do micrótomo (Leica – modelo RM2125RTS) e coletados em lâminas de vidro limpas.

2.8.2 Histologia do ceco

Após separado o fragmento para macerar, o fragmento restante do ceco foi esticado em papel filtro e fixado em formalina tamponada em tampão fosfato 4% e após um mínimo de 48hs as amostras foram processadas para análise histológica.

Os fragmentos fixados foram novamente seccionados, um fragmento de 8mm foi retirado com o auxílio de uma caneta de biópsia, e em seguida desidratados em séries alcoólicas de etanol: 70%, 80%, 95% e 2X absoluto por 15 minutos em cada etapa. As amostras foram diafanizadas em três séries de Xilol por 15 minutos cada, sendo a primeira Etanol/Xilol na proporção 1:1, e as duas seguintes apenas xilol, e infiltradas em parafina com três séries de 30 minutos cada. Os tecidos, após o processamento, foram emblocados em parafina histológica. Cortes finos de 5 μ m foram obtidos com o uso do micrótomo (Leica – modelo RM2125RTS) e coletados em lâminas de vidro limpas.

2.9 Coloração histopatológica

2.9.1 Coloração do baço

Para a realização da coloração do baço, as lâminas contendo os cortes histológicos foram acondicionadas na estufa a 60°C durante 30 minutos para dar início a desparafinização do material. Após este período, as lâminas passaram por duas séries de cinco minutos cada em xilol (Sigma/Aldrich), para que ocorresse a diafanização e clarificação do tecido. Em seguida passaram por uma série decrescente de etanol (absoluto, 90% e 70% por um minuto cada). As lâminas foram lavadas em água destilada e introduzidas no primeiro corante, a hematoxilina de Mayer (Sigma/Aldrich), onde permaneceram durante 40 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por quatro minutos e água destilada por 20 segundos. Em seguida, as lâminas foram imersas em etanol (Merck) à 80% por um minuto e em seguida introduzidas na eosina (Sigma/Aldrich), por dois minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas em água corrente por dois minutos, imersas quatro vezes em água destilada e desidratadas em séries alcoólicas crescentes (em etanol a 70%, 90% e absoluto) por um minuto cada etapa. Após este processo, as amostras foram montadas em lâminas permanentes com Entellan Merck®. A coloração realizada foi a de Hematoxilina e Eosina (H & E), que tem o objetivo de evidenciar o caráter morfológico dos tecidos.

2.9.2 Coloração do ceco

Para a análise do intestino, foi realizada a coloração de hematoxilina e eosina, onde as lâminas contendo os cortes histológicos foram acondicionadas na estufa a 60°C durante 30 minutos para dar início a desparafinização do material. Posteriormente, as lâminas passaram por duas etapas de xilol, sendo de cinco minutos cada, para que ocorresse a diafanização e clarificação do tecido. Em seguida passaram por uma série alcoólica decrescente (absoluto, 90% e 70% por um minuto cada). As lâminas foram lavadas em água destilada e introduzidas no primeiro corante, a hematoxilina de Mayer (Sigma/Aldrich), onde permaneceram durante 40

minutos. Após esse período, foram lavadas em água corrente durante quatro minutos e água destilada por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram imersas em etanol a 80% por um minuto e posteriormente foram introduzidas no segundo corante, a eosina, durante dois minutos. Passado esse período as lâminas foram lavadas em água corrente durante dois minutos, água destilada durante dois minutos e desidratadas em séries alcoólicas crescentes (de etanol 70%, 90% e absoluto) durante um minuto em cada, segundo protocolo adaptado de CAZARI et al., 2013. Ao término da coloração as amostras foram montadas em lâminas permanentes com resina Entellan Merck[®].

Para melhor evidenciar o núcleo das células e estruturas bacterianas, realizamos a coloração com Giemsa. As lâminas com os cortes histológicos foram colocadas em estufa à 37°C, por 30 minutos, banhadas por duas etapas de xilol por cinco minutos em cada, desidratadas em séries alcoólicas de etanol absoluto, 90%, 80% e 70% durante um minuto em cada, lavadas em água corrente durante dois minutos e coradas com Giemsa por 30 minutos ou até que ocorresse o espelhamento deste corante sob a lâmina. Em seguida, o material foi lavado em água corrente, submetido a uma série de ácido acético por 15 segundos e banhado em álcool isopropílico durante três minutos. Ao finalizar, os tecidos corados foram cobertos com Entellan Merck[®] e as lâminas permanentes foram montadas.

Para evidenciar e quantificar as células caliciformes e os enterócitos utilizamos a coloração de PAS, a qual foi realizada com os cortes histológicos que foram colocados em estufa à 37°C, por 30 minutos, para iniciar a desparafinização, depois passaram por duas baterias de xilol, 5 minutos em cada, desidratadas em série de etanol (absoluto, 90%, 85% e 70% por cinco minutos cada), após foram lavadas em água corrente por 5 min e em água destilada por 5 segundos (equivalente a 5 mergulhos). Depois foram oxidadas em ácido periódico 0,5% por 15 minutos, em seguida foram lavadas em água corrente por cinco minutos e banhadas em água destilada cinco vezes. As lâminas foram coradas Reativo de Schiff por 20 minutos, onde o reagente foi aplicado sobre os cortes na lâmina. Posterior a esse período as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e água destilada 5 segundos, contra coradas pela hematoxilina de Harris durante 5 min, novamente lavadas em água corrente por mais 5 minutos, seguida de água destilada mais cinco segundos/mergulhos. Em seguida as lâminas foram desidratadas em séries alcoólicas crescentes (etanol 70%, 85%, 95% - durante 5 min e absoluto 2x – durante 15 min cada). Ao finalizar, os tecidos corados foram cobertos com Entellan Merck[®].

2.10 Análise Morfométrica

2.10.1 Morfometria do baço: Tamanho do baço e da poupa branca

Para avaliarmos o tamanho do baço, os mesmos foram alinhados em uma placa de vidro junto a uma régua milimetrada e fotografados individualmente com o auxílio da câmera do celular (Galaxy S9, versão 10.5.03.19_medida de 4:3 4032x3024_12 MP) durante a necrópsia. As imagens capturadas foram analisadas e os baços medidos com auxílio do software Image J 1.53k, USA.

Para a avaliação a poupa branca do baço, analisamos aleatoriamente, em cortes longitudinais laterais, 6 polpas brancas por animal, padronizando avaliar as imagens capturadas das extremidades direita e esquerda, e do meio baço. Utilizamos o microscópio Olympus BX 53, equipado com a câmera digital Olympus SC100. As imagens foram capturadas em diferentes objetivas para melhor visualização (20X e 40X), foram delimitados os perímetros das polpas brancas e analisadas por meio do programa Olympus Cell Sens Entry 1.18 (Build 16686).

2.10.2 Morfometria do ceco

Utilizando o microscópio Olympus BX 53, equipado com a câmera digital Olympus SC100, foi feita a análise morfométrica das três camadas do intestino grosso/ceco (mucosa, submucosa e camada muscular). Para esta análise, foi utilizado o total de cinco animais por grupo. Na objetiva de 40X, dois campos do corte histológico foram registrados para cada camada e, com o auxílio do programa Olympus CellSensEntry versão 1.18, foram feitas seis medições em diferentes áreas deste tecido para cada imagem de cada uma das três camadas (mucosa epitelial, submucosa e camada muscular) de animais infectados e controle.

2.11 Análise Morfológica

2.11.1 Quantificação de megacariócitos do baço

Para a quantificação dos megacariócitos, selecionamos três regiões de polpa vermelha, equivalentes as extremidades e o centro do baço. Para isso, utilizamos o microscópio Olympus BX53, equipado com a câmera digital Olympus SC100, as imagens foram capturadas na objetiva de 40X, e em seguida, foram marcadas e quantificados todos os megacariócitos presentes na imagem, com o auxílio do programa Olympus Cell Sens Entry 1.18 (Build 16686). Para a contagem, foram apenas consideradas as células cujos núcleos foram visíveis.

2.11.2 Morfologia do ceco

Para a realização da morfologia das células intestinais, analisamos as lâminas coradas com Giemsa. As imagens foram adquiridas com o uso da câmera digital Nikon DS-Ri1 acoplada ao microscópio de luz Nikon Eclipse 80i em sistema de campo claro, as imagens foram capturadas na objetiva de 100X. Foram analisados três animais de cada grupo, sendo feitos três quadrados com 50 μm^2 ao longo da mucosa, na região basal e entre as criptas, e três ao longo da submucosa para cada animal. Após quantificamos e diferenciamos todas as células presentes dentro desses quadrados, sendo diferenciados os linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. Os quadrados foram criados com o auxílio do programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza, Itália).

2.11.3 Contagem de células caliciformes e enterócitos

Para a identificação e quantificação das células caliciformes e dos enterócitos, os cortes histológicos corados com PAS foram analisados com o auxílio do microscópio Olympus BX 53, equipado com a câmera digital Olympus SC100, as imagens foram capturadas na objetiva de 40X, com o auxílio do programa Olympus Cell Sens Entry 1.18 (Build 16686). A

quantificação das células caliciformes e dos enterócitos foram realizadas pelo mesmo software. Foram analisados três animais de cada grupo, sendo feitos quatro quadrados com $50 \mu\text{m}^2$ ao longo da mucosa, no centro das criptas para cada animal. Após quantificamos e diferenciamos todas as células caliciformes e enterócitos presentes dentro desses quadrados.

2.12 Microscopia Eletrônica de Varredura do ceco

Durante a necropsia o ceco foi retirado, aberto e lavado em salina 0,9%, posteriormente esticado em papel filtro e fixado em formalina tamponada em tampão fosfato a 4% durante um período mínimo de 48h. Após a fixação um fragmento do ceco contendo aproximadamente meio centímetro quadrado foi lavado em tampão fosfato durante três vezes, sendo 15 minutos em cada lavagem para retirar o fixador. Usamos o tampão fosfato pois é o mesmo utilizado no preparo do fixador.

Após as lavagens, o fragmento de tecido foi pós fixado em tetróxido de ósmio (Ferrocianeto 2,5% + Ósmio 2%, na proporção 1:1) durante 40 min. Depois da etapa de pós fixação, o fragmento do ceco foi lavado, sendo submerso em água destilada por duas vezes, sendo 10 minutos em cada lavagem. Em seguida, demos início ao processo de desidratação dessa amostra, mantendo o tecido submerso em etanol 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, durante 15 minutos em cada etapa, seguindo para o etanol 90% uma vez e 100% três vezes, durante meia hora em cada etapa.

Quando chegou no etanol 100% foi dado início ao processo de criofratura. Para isso pegamos um pedaço de parafilme e montamos uma espécie de bolsa de aproximadamente 3cm. Dentro dessa bolsa colocamos etanol 100% e o tecido. A bolsa foi cuidadosamente fechada para que o tecido permanecesse emergido no etanol, e em seguida foi totalmente submersa em nitrogênio líquido, até que parasse de borbulhar. Ainda congelado, com o auxílio de uma navalha e superfície metálica também congelada, foi realizada quebra/criofratura deste tecido em diversos pontos diferentes e de forma aleatória.

Dando sequência ao processo de desidratação essa amostra foi levada para a realização do ponto crítico onde o etanol foi substituído por CO_2 , mantendo-a totalmente seca e pronta para a montagem e metalização. Após o ponto crítico a amostra foi montada em stub coberto por fita de carbono e metalizada com 2 nanogramas de ouro. O ponto crítico e a metalização foram realizadas em colaboração com a Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth

na Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz, Pav.Carlos Chagas -Térreo, coordenadas pelo professor Wendell Dias. As análises foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura AURIGA Compact presente na FCM UERJ, com auxílio do técnico Gustavo Rocha.

2.13 FISH do Ceco

Para a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), foi utilizado um dos fragmentos do ceco coletados e fixados em formalina tamponada a 4% por 48 horas. Posteriormente, o fragmento deste tecido foi retirado foi fixador, lavado em PBS estéril e incubado a 4° C em sacarose 10% e 30% por 24 horas cada, posteriormente o fragmento foi retirado da solução, seco em papel toalha, incluído em gel de OCT (Tissue-Tek[®]) e congelado em nitrogênio líquido. No criostato (Leica CM 1850) foram realizados cortes finos com 5 µm a uma temperatura de -25°C, recuperados em lâminas preparadas com L-polilisina (Sigma/Aldrich).

O FISH foi realizado em cada lâmina usando as condições e tampões descritos em Pernthaler et al. (2001) usando 30% de formamida (EMSURE[®]) no tampão de hibridização e sondas para eubactérias (Thermo Fisher Scientific).

Para aderir os cortes na lâmina durante as etapas do FISH, além do preparo prévio com L-polilisina, as lâminas contendo os cortes feitos no criostato foram recobertas com uma fina camada de solução de agarose a 0,1%.

Para o preparo da solução de hibridização foi adicionado em um tubo de 15ml: 360µl de 5M NaCl + 20 µl de Na₂ EDTA 0,5M + 40 µl de 1M Tris/HCl + 2 µl de SDS à 10% + 600 µl de Formamida + 978 µl de água destilada. A solução de hibridização foi pré-aquecida em banho maria à 48 °C.

Durante o FISH os cortes foram desidratados em soluções de etanol 50%, 70% e 100% sendo cinco minutos em cada. Os cortes foram secos à temperatura ambiente. Após a desidratação e secagem, foi adicionado sobre cada corte 9µl do tampão de hibridização pré aquecida a 48°C + 1µl da sonda, de modo que no final tivéssemos a concentração de 5ng/µl da sonda. As lâminas contendo as sondas foram colocadas em câmara úmida, protegidas do abrigo da luz e deixadas na estufa a 48°C durante 3hs.

Para o preparo da solução de lavagem foi adicionado em um tubo de 50ml: 1020 µl de 5M NaCl + 500 µl de Na₂ EDTA 0,5M + 1ml de 1M Tris/HCl + 50 µl de SDS à 10% + água destilada até o volume de 50ml.

Após o período de hibridização, a solução com as sondas foi retirada com o tampão de lavagem, depois os cortes ficaram submersos em mais solução de lavagem, ao abrigo da luz, de volta na estufa a 48°C por mais 20 min.

Após esse procedimento, o tampão de lavagem foi removido e as lâminas foram marcadas com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI - Sigma/Aldrich) diluído 100x, ou seja, na concentração de 0,1µg/ml (10µl de DAPI estoque para 10ml de água destilada), por 10 minutos, protegido da luz, a temperatura ambiente. Após esse período os cortes foram lavados cuidadosamente com água destilada, revestidos com N-propilgalato (Sigma/Aldrich) e lamínula, e observados nos microscópios de fluorescência.

O processamento e análise do FISH foi realizado em colaboração com a Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón-Lins (UNIMICRO), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, subsolo, sala 29 - Cidade Universitária, coordenado pela professora Fernanda Abreu, com auxílio do técnico Jefferson Cypriano. As análises realizadas nos microscópios de fluorescência Zeiss equipado com AxioImager e AxioCam RMC (Zeiss, Alemanha), utilizando os filtros Dye Alexa fluor 488 (Fluorescein e alexa 488 (450/490 - 515 nm), Filter set 09 (488009-9901-000) e o filtro Dye DAPI (DAPI (365 nm - 420 nm), Filter set 02 (488002-9901-000), na UNIMICRO e no microscópio de super-resolução Elyra da Zeiss, em colaboração com a Unidade de Microscopia Avançada do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO/UFRJ) sob o auxílio da tecnóloga Camila Gonçalves.

2.14 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram analisados pelo software de estatística graphpad instat, pelo teste T de Student e plotados em forma de tabela ou gráficos, com auxílio do software graphPad Prism 5. Foi realizado o teste da normalidade em todas as análises. A quantidade de animais e os dados obtidos variou em cada experimento, porém nenhuma teve número amostral inferior a cinco para as análises estatísticas. O resultado das análises estatísticas foram expressas com média e erro padrão, sendo considerados significativos os que possuíam $P > 0,05$.

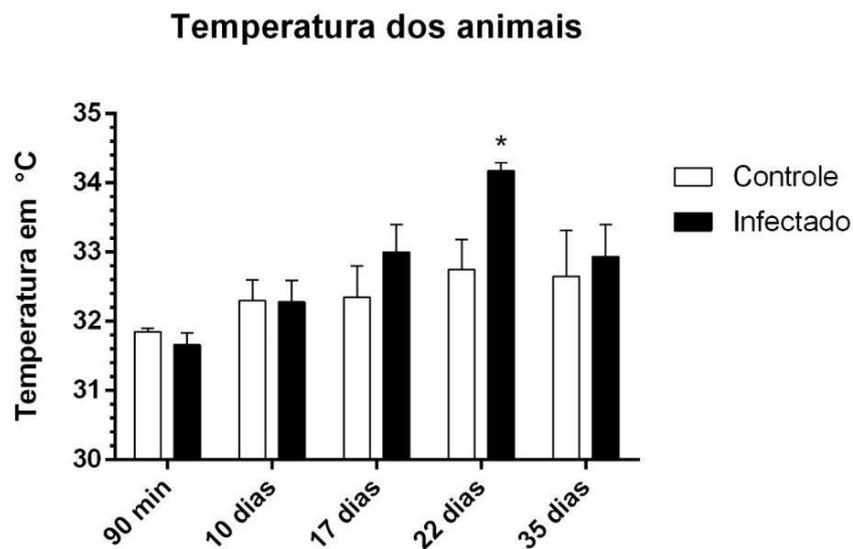
3. RESULTADOS

Em relação a análise dos sinais fisiológicos macroscópicos externos, não observamos alopecia, feridas, diarreia, nem prolapso retal nos camundongos nos diferentes grupos de infectados nem em seus respectivos controles.

3.1 Temperatura dos animais (°C)

A temperatura corporal dos animais se manteve estável em torno de 32°C ao longo da infecção, variando cerca de 0,53°C no grupo controle e 1,4°C no grupo infectado. Observamos que no 22º dia o grupo infectado apresentou temperatura corpórea mais elevada ($34,18 \pm 0,08$) que o grupo controle ($32,75 \pm 0,43$), essa diferença foi estatisticamente significativa ($P = 0,0243$), os valores foram expressos no gráfico 1.

Gráfico 1 - Temperatura dos animais (°C)

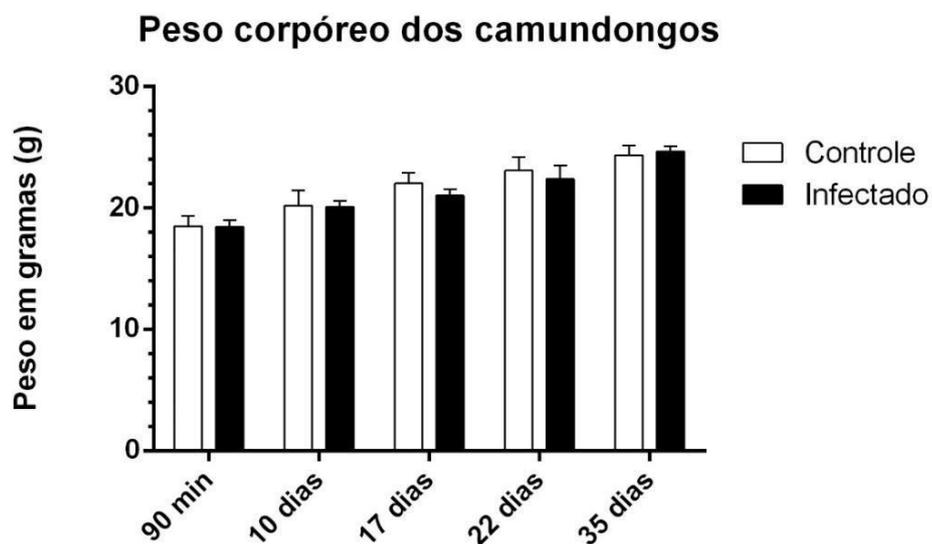


Legenda: Durante a infecção, todos mantiveram a temperatura estável (controles $\cong 32,38^\circ\text{C}$ e infectados $\cong 32,81^\circ\text{C}$). A temperatura foi aferida em graus Celsius. Houve um pico na temperatura corpórea ao 22º dia de infecção, e esse aumento foi significativo $P = 0,0243$. Controle “N” de 5 animais e 6 infectados. Teste estatístico Teste T de Student. Fonte: A autora, 2023.

3.2 Pesagem dos animais (g)

Ao analisarmos o peso corporal dos animais controle e infectado nos diferentes momentos de infecção, observamos que os animais infectados apresentaram uma leve diferença de peso no 17º dia (controle $22,01 \pm 1,89$ e infectado $21,01 \pm 1,50$) e 22º (controle $23,07 \pm 2,45$ e infectado $22,37 \pm 3,40$) dia de infecção, porém não houve diferença estatística significativa no peso corporal em nenhum dos momentos da infecção, conforme apresentado no gráfico 2. Essa discreta diferença foi recuperada no 35º dia (controle $24,34 \pm 1,74$ e infectado $24,63 \pm 1,73$).

Gráfico 2. Peso corpóreo dos animais (g)



Legenda: O peso dos animais foi aferido em gramas. Controle “N” de 5 animais e 9 infectados, exceto 22 dias que tem 13 infectados e 35 dias que tem 16 infectados. Os animais infectados apresentaram uma leve perda de peso, entre o 17º e o 22º. Essa diferença foi recuperada no 35º dia, porém sem diferença estatística significativa. Teste estatístico Teste T de Student. Fonte: A autora, 2023.

3.3 Análises do baço

Na análise macroscópica do baço dos camundongos, observamos que alguns camundongos infectados com 35 dias apresentaram em uma das extremidades coloração alterada, sugerindo hemorragia, conforme figura 6, porém não observamos qualquer alteração histopatológica associada à esta alteração.

Figura 6 - Baço com uma das extremidades alteradas no grupo infectado.



Legenda: Análise macroscópica do baço de um camundongo infectado por *Trichuris muris*, cuja uma de suas extremidades se apresentava enegrecida, círculo vermelho demarcando. Fonte: A autora, 2023.

3.3.1 Peso do baço

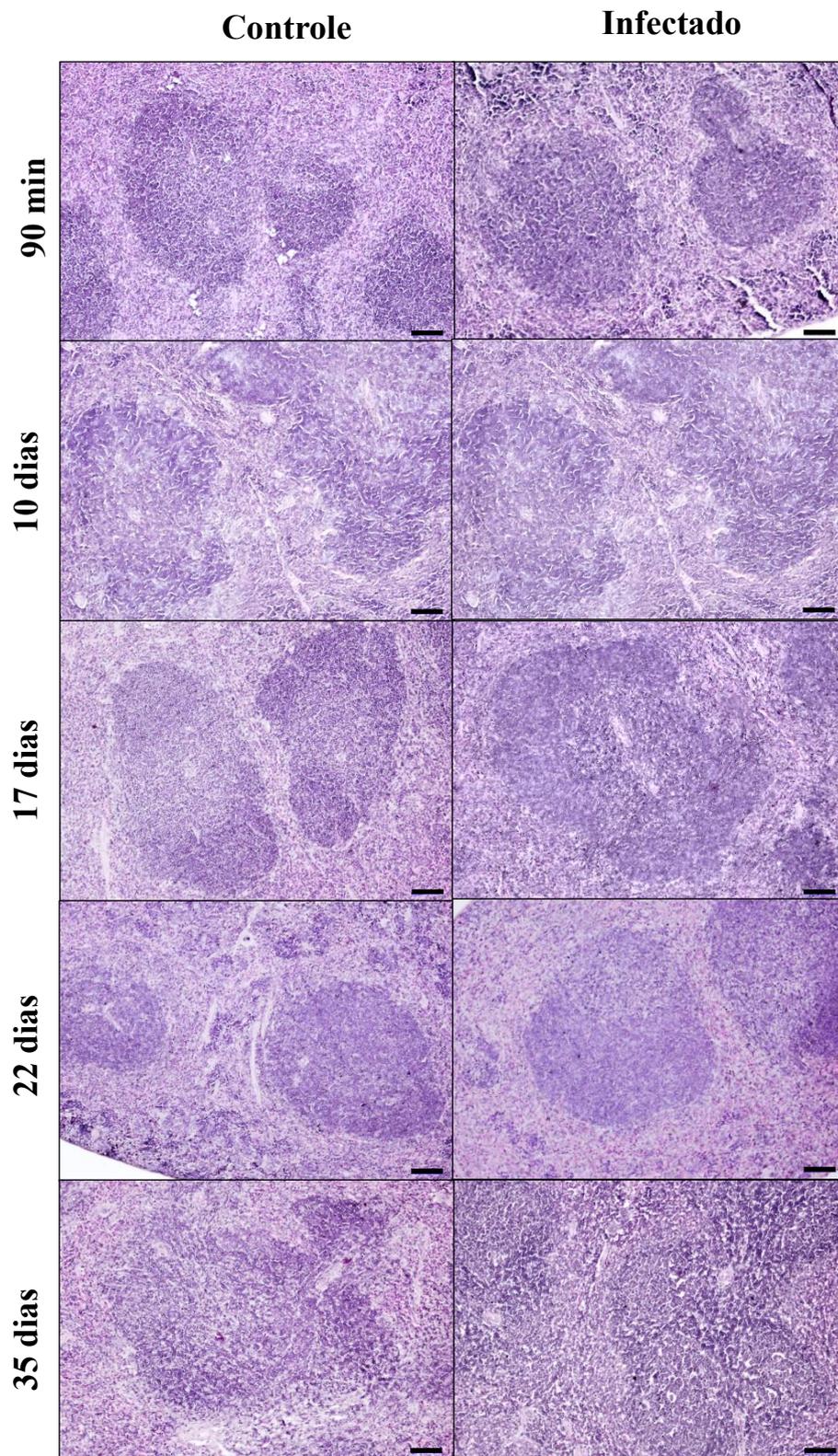
Em relação ao peso do baço, os animais apresentaram pesos dos baços equivalentes, havendo uma pequena alteração apenas com 22 d.p.i., no peso do baço dos camundongos infectados, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, quando analisamos a proporção do peso do baço em relação ao peso corporal, identificamos aumento significativo no peso do baço no 22º d.p.i.. Esta alteração não se manteve entre os grupos infectados e controle com 35 d.p.i., dados expressos na tabela 1.

3.3.2 Morfometria do baço: Tamanho do baço e da polpa branca

Com 22 dias de infecção, o baço dos camundongos infectados ($15,167 \pm 0,4192$) apresentou maior comprimento em comparação com os controles ($13,552 \pm 0,1126$). Essa diferença no tamanho do comprimento do órgão foi observada também com 35° d.p.i, onde os animais infectados apresentaram o baço com maior comprimento ($15,134 \pm 0,22$) que os controles ($13,60 \pm 0,20$), essa diferença foi estatisticamente significativa, com 22 dias ($P= 0,0043$) e 35 dias ($P = 0,0054$) respectivamente. Os dados estão expressos na tabela 1 e gráfico 3.

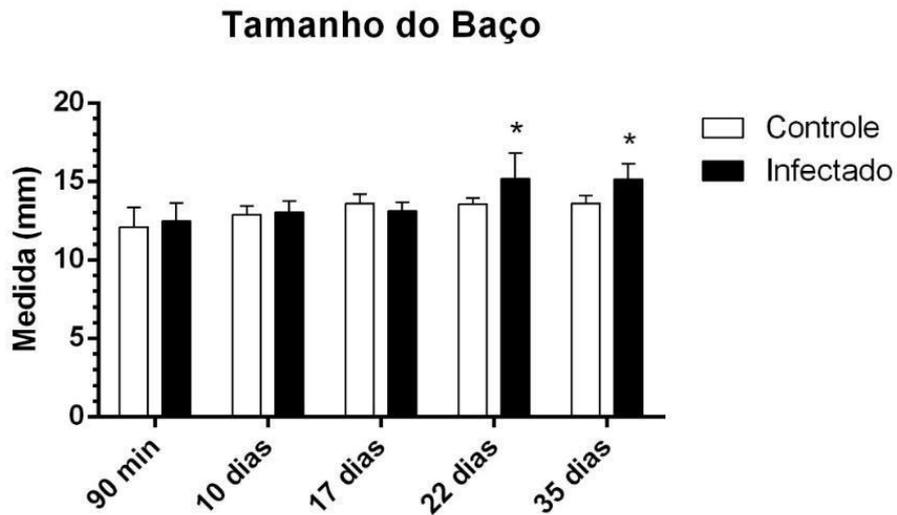
Em relação ao tamanho das polpas brancas, Figura 7, observamos um aumento significativo na área da poupa branca nos camundongos infectados a partir do 17° d.p.i, seguindo pelo 22° até o 35° dia. Os dados foram expressos na tabela 1.

Figura 7 – Histologia do baço mostrando a poupa branca



Legenda: Corte histológico do baço, corado em hematoxilina e eosina nos diferentes tempos de infecção mostrando a poupa branca. Barra de escala 70 μ m. Fonte a autora, 2023.

Gráfico 3. Tamanho do baço (mm)



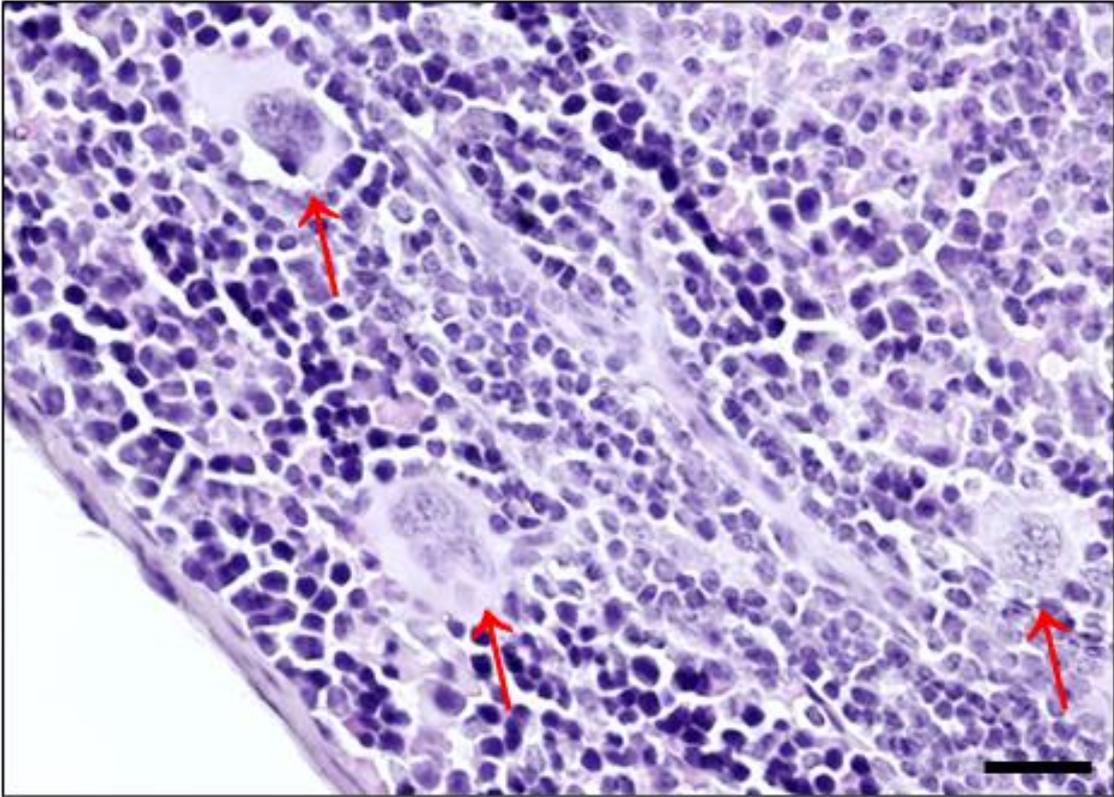
Legenda: A aferição do tamanho do baço nos animais infectados apresentou diferença no 22º e 35º dia em relação aos controles. Teste estatístico Teste T de Student. * Houve diferença estatística significativa $P > 0,05$.

Fonte a autora, 2023

3.3.3 Quantificação de megacariócitos

Em relação a quantidade de megacariócitos, observamos uma diferença significativa ($P = 0,0448$), com 35 d.p.i, onde os animais infectados, figura 8, apresentaram mais megacariócitos ($3,250 \pm 0,6292$) do que o grupo controle ($1,500 \pm 0,2887$), os dados estão expressos na tabela 1.

Figura 8 - Histologia do baço mostrando os megacariócitos



Legenda: Corte histológico do baço, corado em hematoxilina e eosina do camundongo com 35 dias de infecção mostrando os megacariócitos, seta vermelha indica. Barra de escala 20 μ m. Fonte a autora, 2023.

Tabela 1. Dados do baço ao longo da infecção

		90 min	10 dias	17 dias	22 dias	35 dias
		(Média ± E.P)	(Média ± E.P)	(Média ± E.P)	(Média ± E.P)	(Média ± E.P)
Peso do baço (g)	Controle	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02
	Infectado	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	Valor de P	0,2480	0,2181	0,9363	0,0888	0,8911
Peso do baço em relação ao peso corporal (%)	Controle	0,26 ± 0,05	0,36 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,44 ± 0,08
	Infectado	0,35 ± 0,05	0,34 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,44 ± 0,04*	0,44 ± 0,02
	Valor de P	0,0645	0,3450	0,4742	0,0197	0,9060
Tamanho do baço (mm)	Controle	12,10 ± 0,90	12,89 ± 0,24	13,59 ± 0,26	13,55 ± 0,11	13,60 ± 0,20
	Infectado	12,50 ± 0,47	13,03 ± 0,25	13,10 ± 0,24	15,17 ± 0,42*	15,13 ± 0,22*
	Valor de P	0,6889	0,7046	0,2035	0,0043	0,0054
Tamanho da poupa branca (µm)	Controle	97799 ± 12874	140430 ± 38372	48456 ± 4157,3	52010 ± 7948,5	125659 ± 36966
	Infectado	124672 ± 14100	108751 ± 75457	97359 ± 18497*	110657 ± 24721*	102392 ± 6021,5*
	Valor de P	0,1651	0,3629	0,0004	0,0162	0,5272
Quantidade de megacariócitos	Controle	3.250 ± 0.9465	1.667 ± 0.6667	1.750 ± 0.4787	2.250 ± 0.4787	1.500 ± 0.2887
	Infectado	5.000 ± 1.225	3.000 ± 0.7071	3.250 ± 1.315	2.000 ± 0.4082	3.250 ± 0.6292*
	Valor de P	0.3014	0.2422	0.3250	0.7049	0.0448

Legenda: (g) gramas; (%) porcentagem; (mm) milímetros; (Med ± E.P) Média ± Erro padrão. Teste estatístico Teste T de Student. Fonte: a autora, 2023.

3.4 Análise sanguínea

3.4.1 Contagem específica de leucócitos

Para avaliar a circulação e o recrutamento das células imunes dos camundongos durante a infecção, realizamos a contagem específica dos leucócitos circulantes no sangue periférico, que é um exame mais detalhado com base na morfologia do núcleo das células.

Observamos no 10º dia de infecção um aumento significativo no número de eosinófilo ($P = 0,0330$) e neutrófilo ($P = 0,5597$) no grupo infectado (eosinófilos: $4,333 \pm 0,8819$ e neutrófilos: $21,556 \pm 5,164$), quando comparado ao controle (eosinófilo: $1,400 \pm 0,2449$ e neutrófilo: $17,200 \pm 2,375$). E uma queda nos monócitos ($P = 0,0400$) no grupo infectado ($19,222 \pm 2,235$) quando comparado aos controles ($31,800 \pm 6,288$).

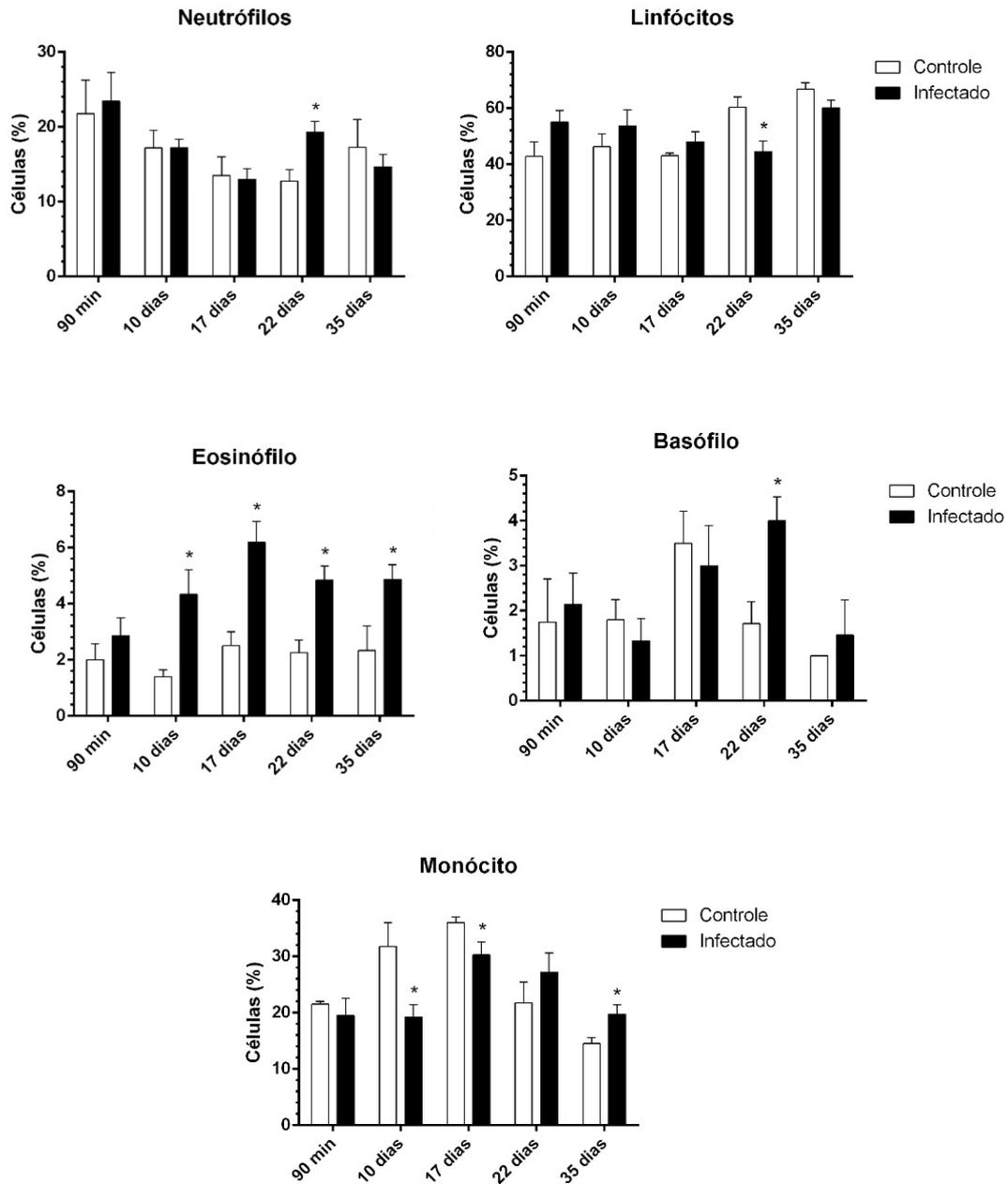
No 17º d.p.i observamos um aumento dos eosinófilos ($P = 0,0322$) e uma queda nos monócitos ($P = 0,0228$) nos camundongos infectados (eosinófilos: $6,200 \pm 0,7348$ e monócitos: $28,000 \pm 2,376$), quando comparado ao controle (eosinófilos: $2,500 \pm 0,5000$ e monócitos: $36,000 \pm 0,4472$).

Com 22 dias houve um aumento significativo dos basófilos ($P = 0,0168$) e neutrófilos ($P = 0,0084$) circulantes no grupo infectado (basófilo: $3,462 \pm 0,3859$; neutrófilo: $19,308 \pm 1,461$) quando comparados ao controle (basófilo: $2,000 \pm 0,3273$; neutrófilo: $12,750 \pm 1,556$) e uma queda nos linfócitos ($P = 0,0111$) do grupo infectado ($44,538 \pm 3,777$) quando comparado ao controle ($60,375 \pm 3,669$).

Com 35 dias houve um aumento significativo nos eosinófilos ($P = 0,0595$) e monócitos ($P = 0,0129$) do grupo infectado (eosinófilo: $4,867 \pm 2,031$; monócito: $19,750 \pm 1,647$), quando comparado ao controle (eosinófilo: $2,333 \pm 0,8819$; monócito: $14,500 \pm 0,5436$).

Vale destacar que as células que mais predominaram foram eosinófilos mostrando aumento significativo a partir do 10º d.p.i, predominando também no 17º e no 35º e os monócitos que houve uma queda significativo no 10º dia, indo até o 17º, invertendo a situação apresentando um aumento significativo no 35º dia pós infecção. Uma oscilação na distribuição dos linfócitos, monócitos e basófilos periféricos no decorrer da infecção, sendo uma queda significativa dos linfócitos e aumento dos basófilos e neutrófilos periféricos com 22 dias de infecção. Ao analisarmos os eosinófilos circulantes notamos um aumento deste grupo celular a partir do 10º dia de infecção, mantendo significativamente elevada as taxas até o 35º dia de infecção, conforme expresso na tabela 2 e Figura 9.

Figura 9 - Prevalência das células observadas nas distensões sanguíneas



Legenda: Número de células expresso em porcentagem. Teste estatístico Teste T de Student. * Houve diferença estatística significativa $P > 0,05$. Fonte: A autora, 2023.

Tabela 2 – Prevalência das células observadas nas distensões sanguíneas

		Linfócito (%) (Média ± E.P)	Neutrófilo (%) (Média ± E.P)	Monócito (%) (Média ± E.P)	Eosinófilo (%) (Média ± E.P)	Basófilo (%) (Média ± E.P)	Bastão (%) (Média ± E.P)
90 min	Controle	49.500 ± 8.500	27.000 ± 8.000	21.500 ± 0.5000	**	1.500 ± 0.5000	**
	Infectado	55.000 ± 4.239	23.444 ± 3.786	15.111 ± 1.859	**	3.000 ± 0.8864	**
	Valor P	P = 0.5914	P = 0.6981	P = 0.1549	**	P = 0.4444	**
10 dias	Controle	46.200 ± 4.641	17.200 ± 2.375	31.800 ± 6.288	1.400 ± 0.2449	1.800 ± 0.2000	**
	Infectado	53.667 ± 5.783	21.556 ± 5.164	19.222 ± 2.235	4.333 ± 0.8819	1.333 ± 0.2108	**
	Valor P	P = 0.4012	P = 0.5597	P = 0.0400*	P = 0.0330*	P = 0.1479	**
17 dias	Controle	41.500 ± 0.5000	23.000 ± 12.000	26.500 ± 10.500	2.500 ± 0.2887	3.500 ± 0.5000	**
	Infectado	48.000 ± 3.606	13.000 ± 1.414	28.000 ± 3.564	6.200 ± 0.4899	4.600 ± 1.030	**
	Valor P	P = 0.3309	P = 0.2000	P = 0.8612	P = 0.0007*	P = 0.5557	**
22 dias	Controle	60.375 ± 3.669	12.750 ± 1.556	21.750 ± 3.712	2.250 ± 0.4532	2.000 ± 0.3273	**
	Infectado	44.538 ± 3.777	19.308 ± 1.461	27.231 ± 3.373	4.846 ± 0.5044	3.462 ± 0.3859	**
	Valor P	P = 0.0111*	P = 0.0084*	P = 0.3052	P = 0.0023*	P = 0.0168*	**
35 dias	Controle	66.750 ± 2.287	17.250 ± 3.728	14.500 ± 1.041	2.333 ± 0,5578	**	**
	Infectado	60.188 ± 2.626	14.000 ± 1.656	19.750 ± 1.647	4.867 ± 0,5243	**	**
	Valor P	P = 0.2450	P = 0.4017	P = 0.1394	P = 0,0116*	**	**

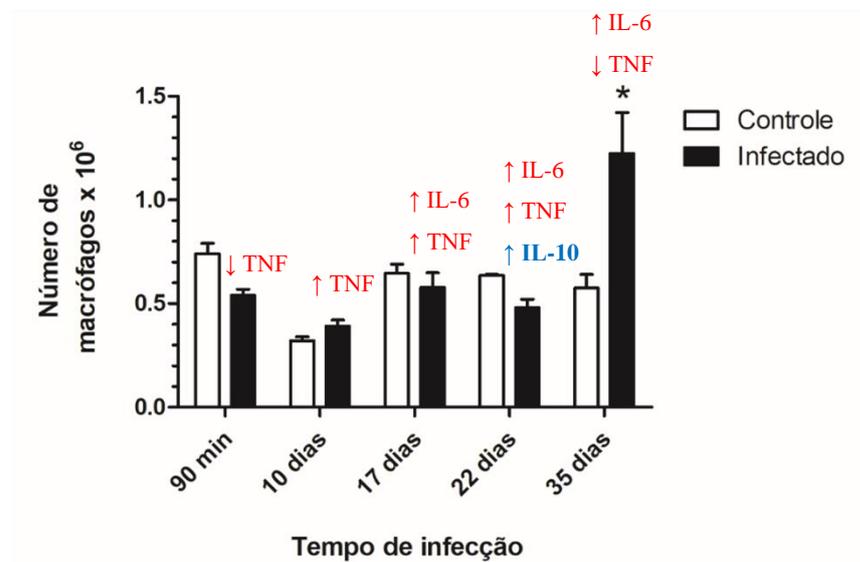
Legenda: (Med ± E.P) Média ± Erro padrão. *Houve diferença estatística significativa. **Não foi possível realizar análise estatística. Fonte: A autora. 2023.

3.5 Análise dos Macrófagos Peritoneais e dosagem de citocinas

3.5.1 Contagem de macrófago peritoneal

A taxa de recuperação de macrófagos peritoneais variou nos diferentes tempos de infecção, tendo um leve predomínio na recuperação dos macrófagos dos grupos controles, sem diferença significativa, porém com 35 dias de infecção observamos um aumento significativo ($p = 0,0714$) dos macrófagos peritoneais recuperados do grupo infectado ($1,23 \times 10^6 \pm 0,48$) quando comparado ao controle ($0,58 \times 10^6 \pm 0,09$), dados expressos no gráfico 4.

Gráfico 4 - Contagem de macrófagos peritoneais e citocina do sobrenadante destes macrófagos



Legenda: Contagem de macrófagos peritoneais. Sendo dois animais controles e cinco infectados. Análise estatística pelo teste estatístico T-Student. *Houve diferença estatística significativa. Variação das citocinas observadas no grupo infectado.

Fonte: A autora, 2023.

3.5.2 Dosagem de citocinas dos macrófagos peritoneais

Com 90 minutos de infecção observamos uma queda significativa nas taxas de TNF ($p = 0,0339$) no grupo infectado ($289,84 \pm 96,136$) quando comparado ao controle ($1736,10 \pm 228,30$). Essa queda também foi observada no 35º dia ($p = 0,0399$) no grupo infectado ($623,34 \pm 107,53$) quando comparado ao controle ($1092,3 \pm 178,09$). Porém a partir do 10º dia de infecção observamos um aumento significativo ($p = 0,0045$) desse TNF no grupo infectado ($287,93 \pm 65,478$) quando comparado ao controle ($14,670 \pm 0,9033$), que se estende pelo 17º dia ($p = 0,0398$ - infectado: $420,95 \pm 126,54$; controle: $7,457 \pm 1,572$) até o 22º dia ($p = 0,0309$ - Infectado: $1381,7 \pm 409,17$; controle: $289,67 \pm 59,647$).

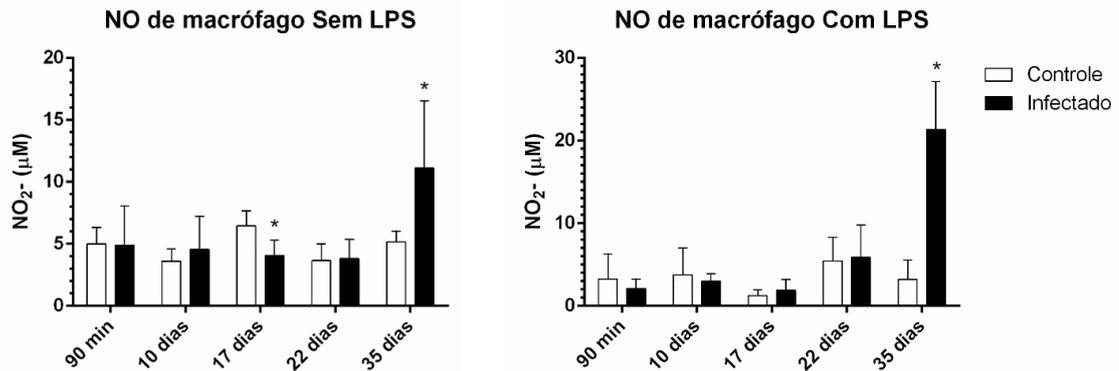
Em relação a IL-6, notamos um aumento significativo dessa citocina no grupo infectado entre o 17º dia ($p = 0,0400$ - Infectado: $1814,6 \pm 459,75$; Controle: 2.760 ± 0.080), 22º dia ($p = 0,0189$ - Infectado: $7560,20 \pm 932,22$; Controle: $1077,4 \pm 952,32$) e 35º dia ($p = 0,0019$ - Infectado: $11494,00 \pm 671,68$; Controle: $4181,60 \pm 149,60$) de infecção.

Observamos também um aumento significativo da citocina regulatória, IL-10, com 22º dia ($p = 0,0231$) no grupo infectado ($27,580 \pm 6,654$) quando comparado ao controle ($7,030 \pm 1,688$). Dados expressos no gráfico 4.

3.5.3 Dosagem de Óxido Nítrico dos Macrófagos

Ao analisarmos a dosagem do óxido nítrico dos macrófagos peritoneais sem estímulo de LPS, observamos uma queda significativa ($p = 0,0019$) de óxido nítrico produzido pelos macrófagos peritoneais dos camundongos infectados ($6,48 \pm 0,42$) quando comparado aos do grupo controle ($4,08 \pm 0,46$) com 17 dias de infecção, e um aumento significativo na produção de NO no grupo infectado ($5,18 \pm 0,38$) quando comparado ao controle ($11,12 \pm 2,05$) com 35 dias de infecção. Esse aumento na produção de NO também foi observado nos macrófagos estimulados com LPS do grupo infectado ($3,22 \pm 1,15$) quando comparados aos controles ($21,37 \pm 2,90$) com 35 dias de infecção, dados expressos no gráfico 5.

Gráfico 5. Dosagem do óxido nítrico dos macrófagos peritoneais



Legenda: Dosagem de óxido nítrico dos macrófagos peritoneais sem estímulo de LPS e estimulados com LPS. Análise estatística pelo teste estatístico T-Student. *Houve diferença estatística significativa. Fonte: A autora, 2023.

3.6 Análise do Ceco

3.6.1 Peso do ceco sem fezes e a relação da quantidade de fezes no ceco

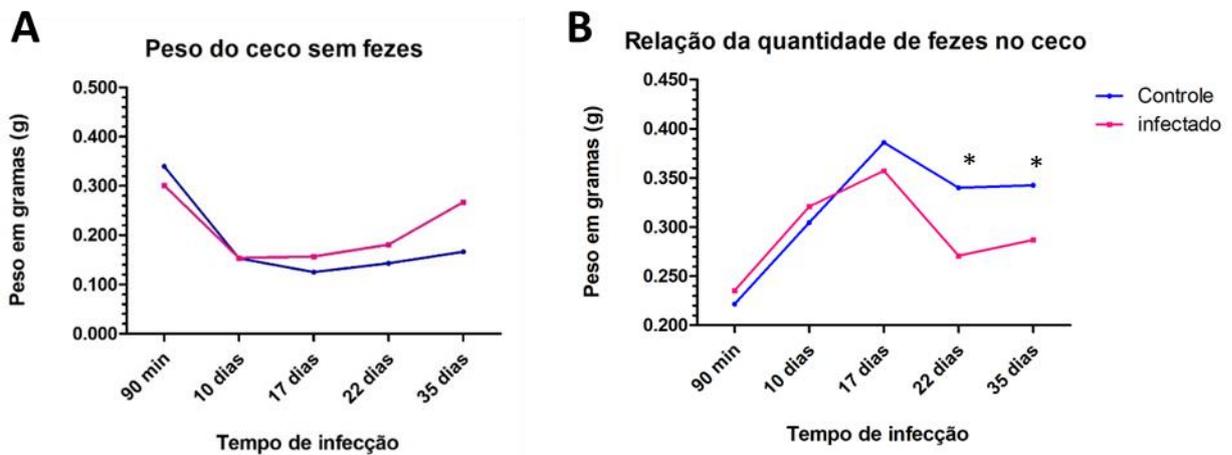
Durante o parasitismo por *Trichuris muris*, o ceco é o sítio de preferência deste parasito. A presença do parasito causa um enrijecimento visível do tecido local, sendo mais evidente com 35 dias de infecção. Para avaliar os danos das alterações ocorridas no ceco, foi feita a pesagem dos mesmos fragmentos intestinais com fezes e sem fezes antes de serem fixados para histologia.

Ao analisarmos a pesagem do ceco sem fezes, observamos que o tecido começa a se apresentar mais pesados a partir do 10º dia de infecção, sendo este aumento crescente até o 35º dia. Apesar de um crescente aumento no peso, esta diferença só foi estatisticamente significativa no 35º dia de infecção ($p = 0,0260$) quando comparamos o grupo controle ($0,17 \pm 0,02$) com infectado ($0,27 \pm 0,03$), conforme apresentados no gráfico 6A.

Ao verificarmos a diminuição da diferença entre os pesos do ceco com fezes em comparação com o ceco sem fezes de cada animal, obtivemos como resultado o conteúdo fecal contido nesse órgão. Observamos que os animais infectados, após o 10º dia de infecção tinham menos fezes contidas no ceco, em comparação com os animais controles, porém só foi possível observar diferença estatística significativa ($p = 0,0163$) a partir do 22º dia de infecção, onde os animais infectados continuaram

apresentando menos conteúdo fecal ($0,2317 \pm 0,02$) que os controles ($0,3400 \pm 0,02$). Essa diferença se estendeu até 35º dia de experimento ($p = 0,0280$), onde os infectados continuaram com menos conteúdo fecal ($0,2408 \pm 0,02$) que os controles ($0,3424 \pm 0,05$), gráfico 6.

Gráfico 6 - Peso do ceco (g) sem fezes e a relação da quantidade de fezes no ceco

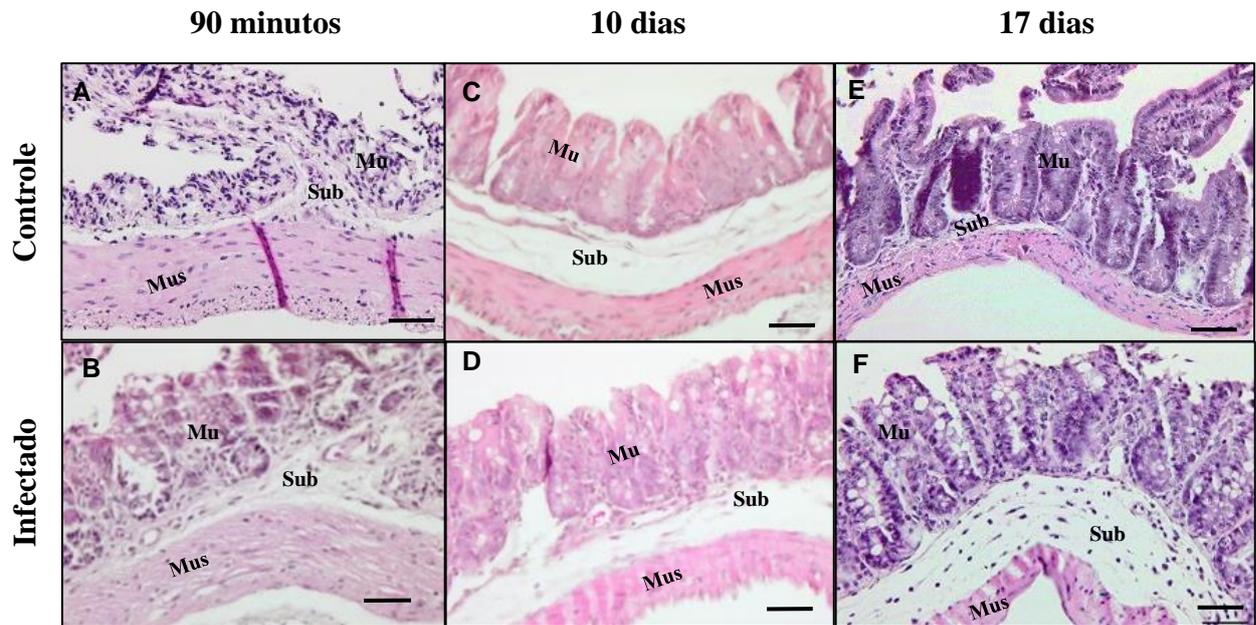


Legenda: A – gráfico do peso do ceco com fezes. B - Gráfico da relação da quantidade de fezes no ceco. Controle e infectado “N” de 5 animais controles e 8 infectados, exceto 22 dias 11 infectados e 35 dias que tem 15 infectados. Análise estatística pelo Teste T de Student. * houve diferença estatística significativa. Fonte: A autora, 2023.

3.6.2 Morfometria do ceco

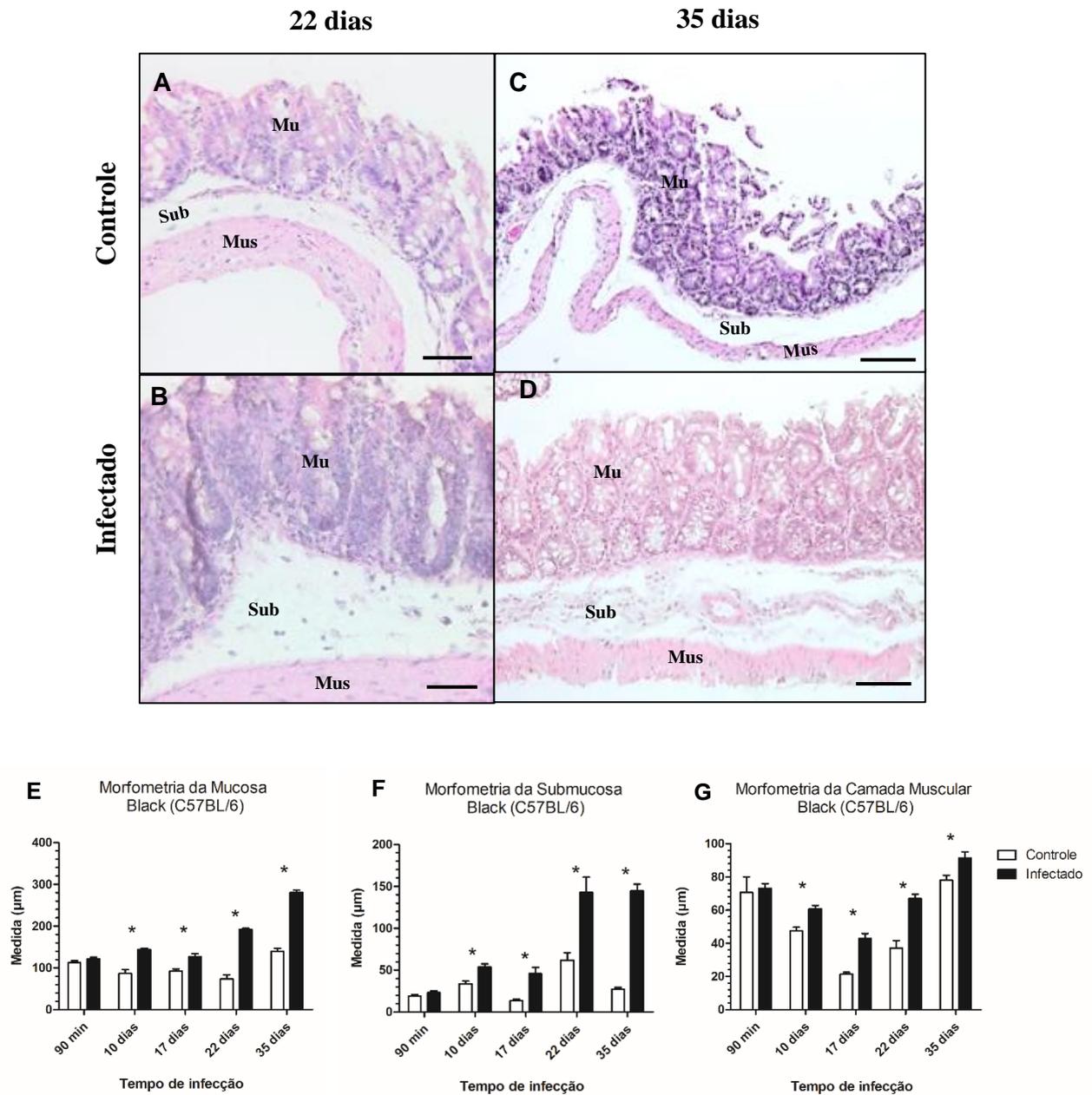
Na análise morfométrica, foi possível observar um espessamento significativo nas camadas da mucosa, submucosa e camada muscular a partir do 10º dia de infecção, onde na mucosa e submucosa é possível observar um intenso infiltrado inflamatório. Além disso na mucosa observamos a presença do parasito inserido e um aumento de enterócitos e células caliciformes. Esse espessamento na mucosa, submucosa e camada muscular do ceco vai se tornando cada vez mais intenso no grupo infectado até o 35ª dia de infecção. Dados expressos na figura 10 e 11.

Figura 10 - Morfometria e morfologia do ceco com 90 minutos, 10 e 17 dias



Legenda: Cortes histológicos do intestino corado com HE. Sendo A,C e E grupo controle e B, D e F grupo infectado por *T.muris*. A e B com 90 minutos de infecção; C e D com 10 dias de infecção; E e F com 17 dias de infecção. Mucosa (Mu), Submucosa (Sub) e camada muscular (Mus). Barra de escala 100µm. Fonte: A autora, 2023.

Figura 11 - Morfometria e morfologia do ceco com 22 e 35 dias



Legenda: Cortes histológicos do intestino corado com HE. Sendo A e C grupo controle e B e D grupo infectado por *T. muris*. A e B com 22 dias de infecção, barra de escala 50µm. C e D com 35 dias de infecção, barra de escala 100µm. Sendo a representação da morfometria da mucosa (Mu), Submucosa (Sub) e camada muscular (Mus) localizadas abaixo dos cortes histológicos. * Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora, 2023.

3.6.3 Morfologia do ceco

Na análise morfológica do ceco é possível observar um aumento significativo no número de células inflamatórias submucosa intestinal dos camundongos infectados a partir do 10º dia de infecção, crescendo até o 35º dia de infecção. Enquanto que na mucosa intestinal, apesar de também haver um aumento no número de células inflamatórias a partir do 10º dia de infecção, a significância oscila, sendo significativo com 10 dias de infecção o aumento de eosinófilo e neutrófilo, com 17 dias foi significativo o aumento no número de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Com 22 dias houve um aumento significativo de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos e com 35 dias houve um aumento significativo de eosinófilo e macrófago na mucosa intestinal. Dados detalhados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Análise morfológica mucosa intestinal

		Eosinófilo (Med±E.P)	Macrófago (Med±E.P)	Neutrófilo (Med±E.P)	Linfócito (Med±E.P)
90 minutos	Controle	0,17 ± 0,17	5,17 ± 1,08	2,67 ± 0,42	1,33 ± 0,33
	Infectado	0,17 ± 0,17	7,83 ± 1,25	2,83 ± 0,79	1,00 ± 0,26
	Valor de P	p > 0,999	p = 0,1371	p = 0,8564	p = 0,4475
10 dias	Controle	0,17 ± 0,17	9,00 ± 1,32	3,17 ± 0,54	1,17 ± 0,31
	Infectado	3,17 ± 0,70*	12,5 ± 1,20	5,83 ± 0,91*	2,83 ± 0,70
	Valor de P	p = 0,0020	p = 0,0782	p = 0,0305	p = 0,0550
17 dias	Controle	0,17 ± 0,17	7,33 ± 1,38	2,28 ± 0,41	1,94 ± 0,36
	Infectado	6,50 ± 1,12*	15,67 ± 0,80*	4,67 ± 0,63*	3,83 ± 0,37*
	Valor de P	p = 0,0003	p = 0,0004	p = 0,0032	p = 0,0010
22 dias	Controle	1,39 ± 0,39	4,06 ± 0,88	2,39 ± 0,37	1,83 ± 0,35
	Infectado	3,00 ± 0,43*	6,83 ± 1,21	3,94 ± 0,54*	3,50 ± 0,42*
	Valor de P	p = 0,0086	p = 0,0717	p = 0,0233	p = 0,0047
35 dias	Controle	1,39 ± 0,39	5,67 ± 1,43	4,67 ± 1,05	3,50 ± 0,89
	Infectado	3,06 ± 0,43*	12,83 ± 1,74*	6,33 ± 1,20	4,50 ± 0,50
	Valor de P	p = 0,0070	p = 0,0098	p = 0,3217	p = 0,3484

Legenda: Média da quantidade de células presente a cada 50µm². (Med ± E.P) Média ± Erro padrão. *Houve diferença estatística significativa (P > 0,05). Teste T de Student.

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 4 - Análise morfológica submucosa intestinal

		Eosinófilo (Med±E.P)	Macrófago (Med±E.P)	Neutrófilo (Med±E.P)	Linfócito (Med±E.P)
90 minutos	Controle	0,17 ± 0,17	6,67 ± 1,17	2,17 ± 0,40	2,67 ± 0,33
	Infectado	0,17 ± 0,17	6,67 ± 0,72	2,50 ± 0,56	2,33 ± 0,92
	Valor de P	p > 0,9999	p > 0,9999	p = 0,6400	p = 0,7402
10 dias	Controle	0,17 ± 0,17	4,00 ± 1,03	1,33 ± 0,42	0,83 ± 0,17
	Infectado	1,33 ± 0,42*	10,67 ± 1,76*	3,00 ± 0,37*	2,50 ± 0,34*
	Valor de P	p = 0,0277	p = 0,0086	p = 0,0136	p = 0,0014
17 dias	Controle	0,50 ± 0,22	5,17 ± 0,91	1,50 ± 0,43	0,83 ± 0,31
	Infectado	4,33 ± 1,56*	9,17 ± 1,52*	6,17 ± 1,14*	3,50 ± 0,81*
	Valor de P	p = 0,0356	p = 0,0471	p = 0,0033	p = 0,0114
22 dias	Controle	0,17 ± 0,17	3,17 ± 0,31	1,50 ± 0,43	0,67 ± 0,21
	Infectado	2,67 ± 0,72*	9,50 ± 1,09*	5,00 ± 0,86*	3,50 ± 0,34*
	Valor de P	p = 0,0067	p = 0,0002	p = 0,0044	p < 0,0001
35 dias	Controle	0,17 ± 0,17	2,50 ± 0,43	1,17 ± 0,48	0,33 ± 0,21
	Infectado	4,50 ± 0,67*	13,67 ± 1,28*	9,67 ± 1,15*	8,33 ± 1,75*
	Valor de P	p < 0,0001	p < 0,0001	p < 0,0001	p = 0,0011

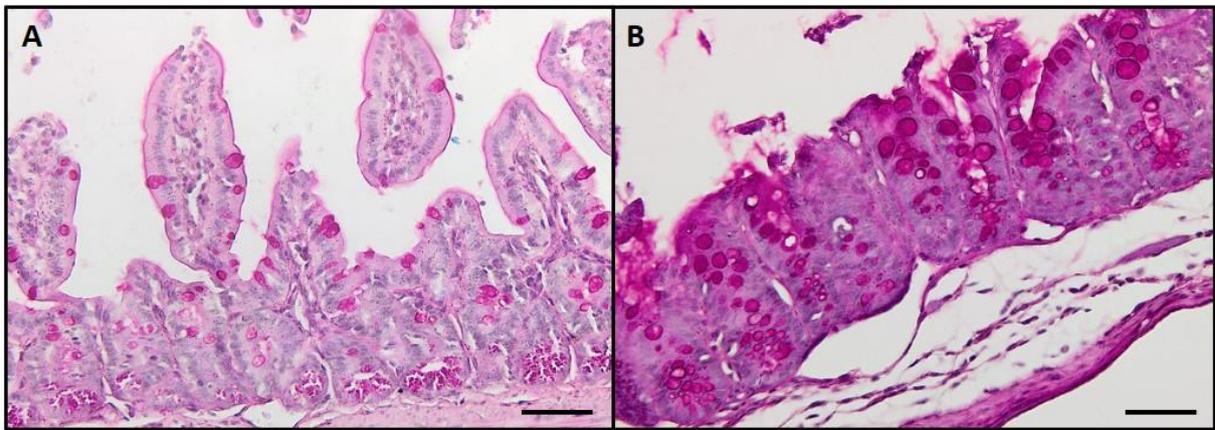
Legenda: Média da quantidade de células presente a cada 50µm². (Med ± E.P) Média ± Erro padrão. *Houve diferença estatística significativa (p > 0,05). Teste T de Student.

Fonte: A autora, 2023.

3.6.4 Quantificação de células caliciformes e enterócitos

Em relação a quantificação das células caliciformes, observamos um aumento significativo no número dessas células a partir do 17º dia de infecção ($p = 0,0448$), se estendendo pelo 22º ($p = 0,0187$) e 35º ($p = 0,0249$) dia de infecção, figura 12.

Figura 12. Quantificação de células caliciformes e dos enterócitos



Quantificação de células caliciformes e dos enterócitos

		90 min	10 dias	17 dias	22 dias	35 dias
		(Med±EP)	(Med±EP)	(Med±EP)	(Med±EP)	(Med±EP)
Células caliciformes	Controle	74,75 ± 2,81	64,50 ± 4,87	48,50 ± 6,70	47,0 ± 7,65	35,50 ± 5,50
	Infectado	54,50 ± 1,71	38,67 ± 1,22	114,0 ± 25,03*	111,67 ± 19,79*	109,50±24,29*
	Valor de P	P = 0,4100	P = 0,0659	P = 0,0448	P = 0,0187	P = 0,0249
Enterócitos	Controle	51,69 ± 4,79	62,56 ± 2,02	59,38 ± 2,36	51,06 ± 4,64	50,63 ± 2,84
	Infectado	52,81 ± 4,34	83,94 ± 4,10*	79,88 ± 2,18*	86,00 ± 2,82*	83,88 ± 3,87*
	Valor de P	P = 0,8631	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001

Legenda: Corte histológico do ceco de camundongos com 17 dias de infecção, corados com PAS, mostrando hiperplasia das células caliciformes e enterócitos quando comparados à figura 8A, camundongo controle, com a figura 8B, camundongo infectado. Tabela com a média do quantitativo de células encontradas. (Med ± E.P) Média ± Erro padrão. *Houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Teste T de Student. Fonte: A autora, 2023.

3.7 Dosagens de citocinas

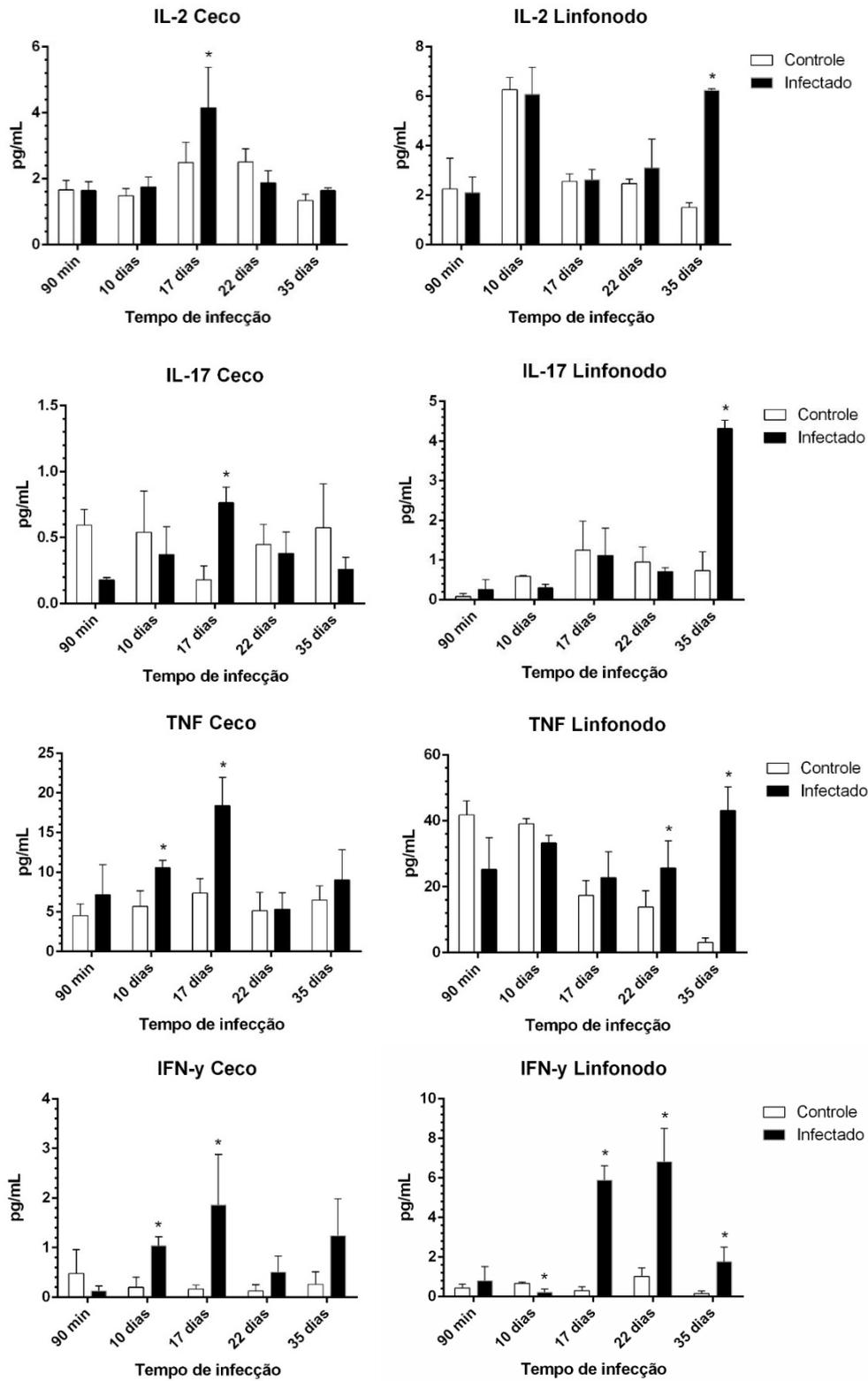
3.7.1 Dosagem de citocinas do ceco

Na dosagem das citocinas presentes no macerado do ceco, observamos um aumento significativo ($p = 0,0274$) de IL-2 nos camundongos infectados ($4,153 \pm 0,6109$) quando comparados ao controle ($2,493 \pm 0,3080$) e também de IL-17 ($p = 0,0099$) no grupo infectado ($0,7650 \pm 0,1184$) quando comparado ao controle ($0,1800 \pm 0,1039$) com 17 dias de infecção, resultado expresso na figura 13.

Com 10 dias observamos um aumento significativo de TNF ($p = 0,0039$) no ceco do grupo infectado ($10,565 \pm 0,9551$) quando comparado ao controle ($3,830 \pm 0,8388$) e com 17 dias também houve um aumento de TNF ($p = 0,0098$) no grupo infectado ($18,398 \pm 2,343$) quando comparado ao controle ($7,355 \pm 1,077$), resultado expresso na figura 13.

Observamos um aumento de IFN- γ ($p = 0,0376$) no ceco do grupo infectado ($1,037 \pm 0,1810$) em relação ao controle ($0,2033 \pm 0,2033$) com 10 dias de infecção, e um aumento ($p = 0,0255$) também com 17 dias no grupo infectado ($1,860 \pm 0,6452$) quando comparado ao controle ($0,1633 \pm 0,0519$), resultado expresso na figura 13.

Figura 13. Citocinas de perfil Th1 presentes no ceco e linfonodo, ao longo da infecção.



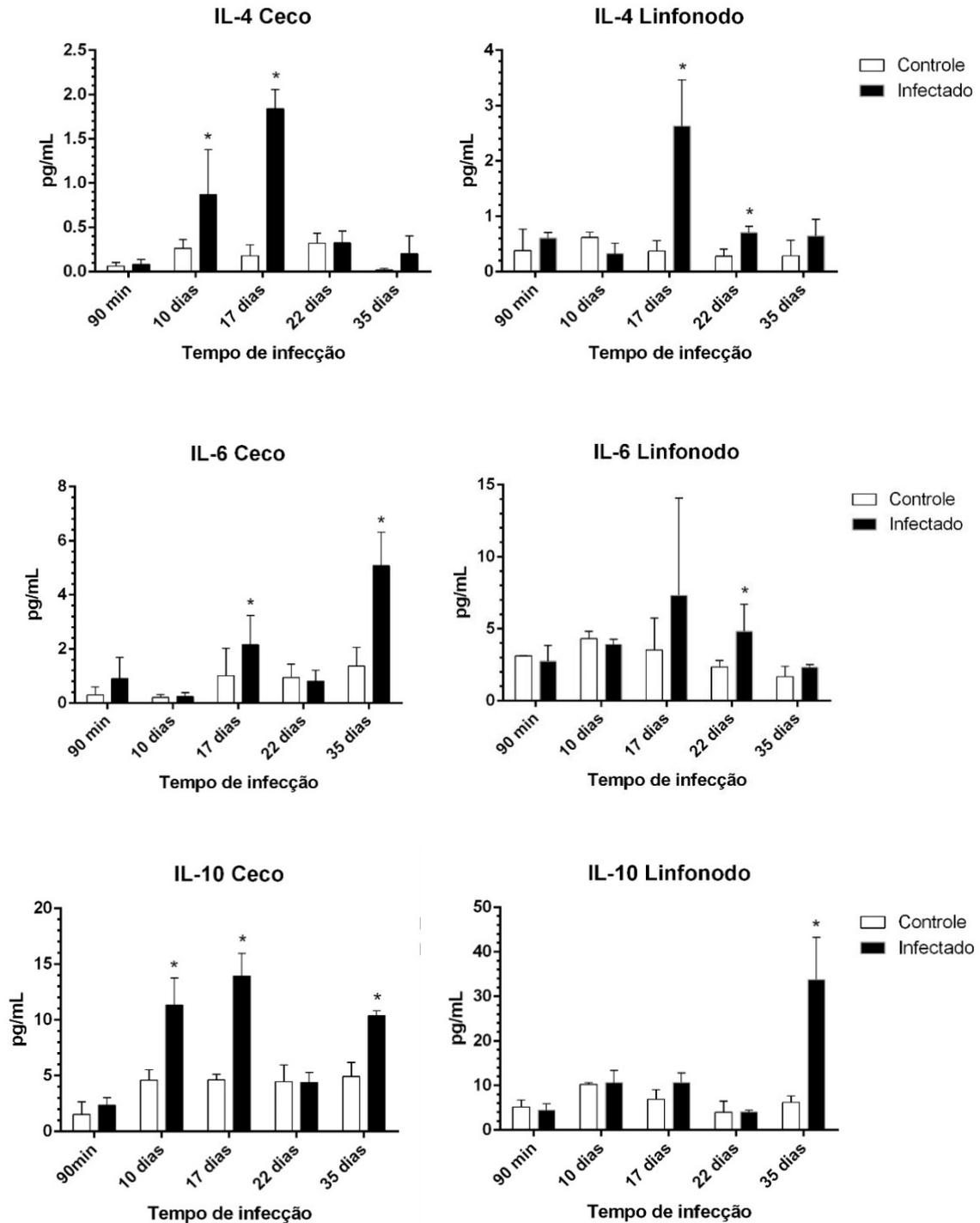
Legenda: Dados das dosagens das citocinas expressos em picograma por mililitro. * Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora, 2023.

Com 10 dias no grupo infectado ($1,675 \pm 0,5050$) também apresentou no ceco um aumento ($p = 0,0414$) de IL-4 quando comparado ao controle ($0,3500 \pm 0,0656$). Com 17 dias esse aumento ($p = 0,0276$) de IL-4 também se apresentou significativo nos animais infectados ($1,840 \pm 0,2200$) quando comparado ao controle ($0,2700 \pm 0,1500$), resultado expresso na figura 10.

Em relação a IL-6, com 17 dias observamos um aumento significativo ($p = 0,0093$) no ceco dos camundongos infectados ($3,240 \pm 0,0751$) quando comparados aos camundongos do grupo controle ($1,015 \pm 0,5860$). Com 22 dias não notamos diferença, porém com 35 dias voltamos a observar um aumento ($p = 0,0212$) significativo de IL-6 nos camundongos infectados ($5,080 \pm 1,241$) quando comparados aos camundongos controle ($1,833 \pm 0,4566$), resultado expresso na figura 10.

Observamos também um aumento da IL-10 com: 10 dias ($p = 0,0302$), no grupo infectado ($11,330 \pm 2,440$) em relação ao controle ($4,604 \pm 0,929$); 17 dias ($p = 0,0046$), no grupo infectado ($13,925 \pm 2,052$) em relação ao controle ($4,645 \pm 0,4821$); 35 dias ($p = 0,0462$), no grupo infectado ($10,375 \pm 0,4450$) em relação ao controle ($4,940 \pm 1,256$), resultado expresso na figura 10.

Figura 14. Citocinas de perfil Th2 presentes no ceco e linfonodo ao longo da infecção.



Legenda: Dados das dosagens das citocinas expressos em picograma por mililitro. * Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). Fonte: A autora, 2023.

Dosagem de citocina nos linfonodos mesentéricos

Na dosagem das citocinas presentes no macerado do linfonodo mesentérico, observamos um aumento significativo ($p = 0,0003$) de IL-2 nos camundongos infectados ($6,240 \pm 0,0700$) quando comparados ao controle ($1,507 \pm 0,1910$) e também de IL-17 ($P = 0,0042$) no grupo infectado ($4,313 \pm 0,2133$) quando comparado ao controle ($0,7300 \pm 0,4800$) com 35 dias de infecção, resultado expresso na figura 13.

Observamos um aumento significativo de TNF com 22 dias ($p = 0,0258$) no grupo infectado ($25,667 \pm 4,115$) quando comparado ao controle ($13,887 \pm 2,463$) e com 35 dias também houve um aumento de TNF ($p = 0,0054$) no grupo infectado ($43,148 \pm 7,141$) quando comparado ao controle ($3,350 \pm 1,315$), resultado expresso na figura 13.

Observamos nos linfonodos, com 10 dias, uma queda significativa de IFN- γ ($p = 0,0482$) no grupo infectado ($0,2200 \pm 0,1600$) em relação ao controle ($0,6700 \pm 0,05568$), porém com 17 dias houve um aumento ($p = 0,0005$) significativo de IFN- γ no grupo infectado ($5,890 \pm 0,7200$) quando comparado ao controle ($0,3050 \pm 0,2006$). Esse aumento de IFN- γ persistiu no 22º dia ($p = 0,0117$), onde os camundongos infectados apresentaram $6,820 \pm 1,685$ pg/ml enquanto os camundongos controle apresentaram uma média de $1,025 \pm 0,4189$ pg/ml. Com 35 dias de infecção ainda houve um aumento significativo ($P = 0,0241$) de IFN- γ nos camundongos infectados ($1,763 \pm 0,4625$) quando comparados aos camundongos controle ($0,1500 \pm 0,0751$), os resultados foram expressos na figura 13.

Com 17 dias o grupo infectado ($2,633 \pm 0,8359$) também apresentou um aumento ($p = 0,0386$) de IL-4 nos linfonodos quando comparado ao controle ($0,3713 \pm 0,1887$). Com 22 dias esse aumento ($p = 0,0471$) de IL-4 também se apresentou significativo nos animais infectados ($0,7050 \pm 0,1165$) quando comparado ao controle ($0,2800 \pm 0,1247$), resultado expresso na figura 14.

Em relação a IL-6, nos linfonodos, com 22 dias, observamos um aumento significativo ($p = 0,0408$) camundongos infectados ($4,820 \pm 1,191$) quando comparados aos camundongos do grupo controle ($2,358 \pm 0,2970$), resultado expresso na figura 14.

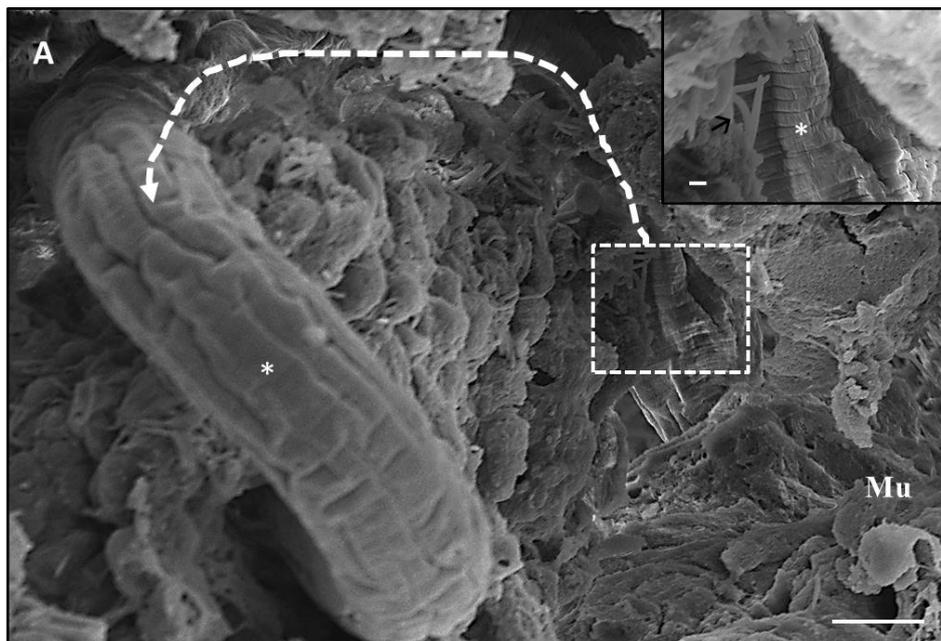
Também observamos nos linfonodos um aumento da IL-10 com 35 dias ($p = 0,0026$), no grupo infectado ($33,763 \pm 6,188$) em relação ao controle ($6,213 \pm 0,9029$), resultado expresso na figura 14.

3.8 Ultraestrutura da colonização *T. muris* no tecido hospedeiro

A partir do 10º dia de infecção já é possível visualizar o *T. muris* inserido na mucosa intestinal, formando o túnel sincicial, o qual é um ambiente protegido e uma fonte contínua de nutrientes para

o verme, além disso é possível acompanhar o percurso realizado pelo parasito ao se ancorar no tecido. Com 10 dias de infecção, já é possível visualizar partes do túnel sincicial e identificar o rompimento da superfície epitelial, além da presença de bactérias próximas à ruptura, figura 15.

Figura 15. MEV do ceco com o *Trichuris muris* rompendo a mucosa intestinal com 10 dias de infecção.



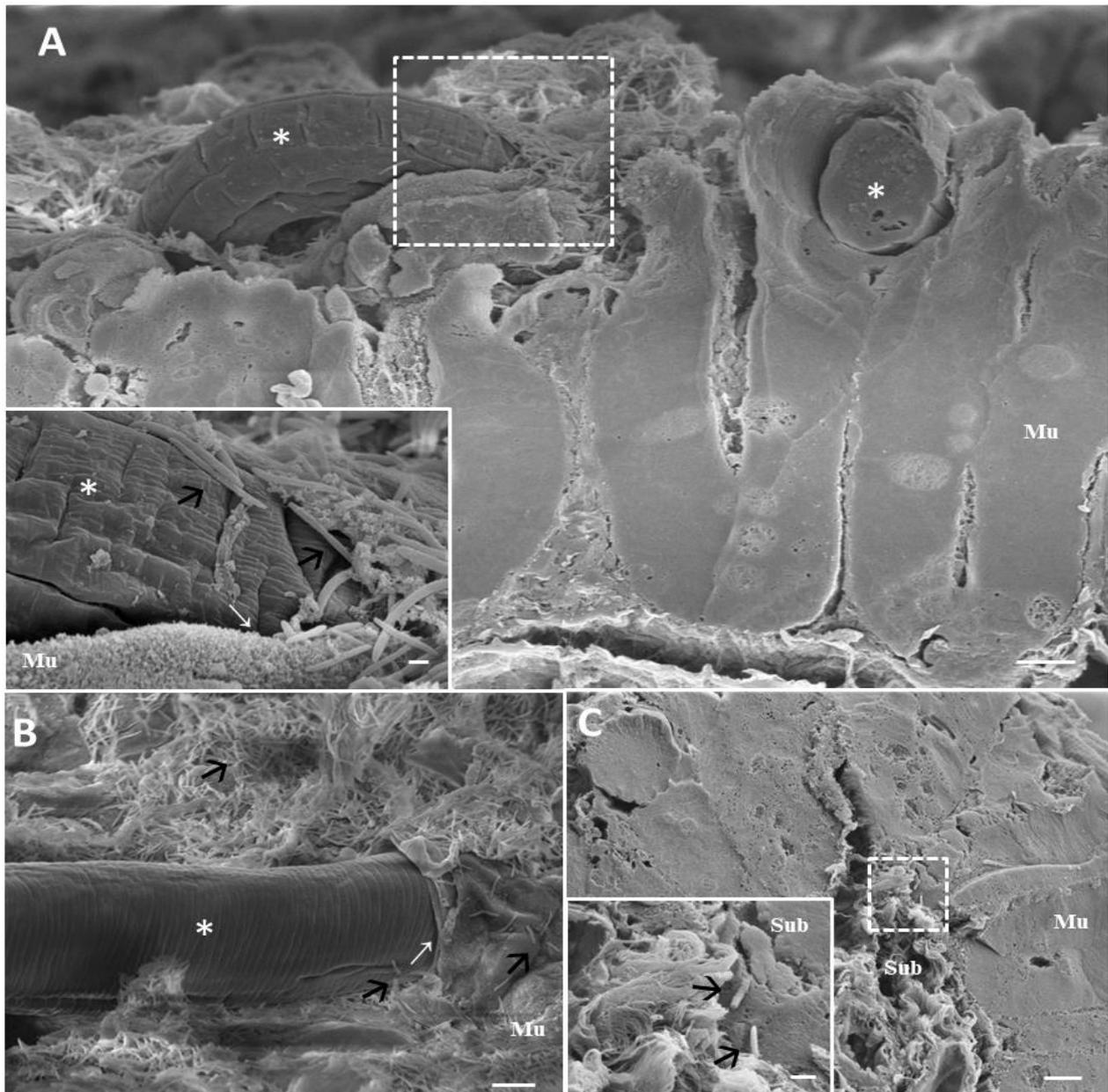
Legenda: MEV do ceco de camundongos infectados por *Trichuris muris*, com 10 dias de infecção. Figura A – mostrando a mucosa intestinal e o percurso realizado pelo parasito que se encontra inserido na mucosa e rompendo partes da mucosa intestinal, com bactérias próximas a ruptura. Destaque – detalha em maior aumento o parasito penetrando na mucosa e carregando bactérias presentes na mucosa. Um – Mucosa; * - *T. muris*; Seta branca pontilhada mostrando o caminho percorrido pelo parasito na mucosa intestinal; Seta preta – bactérias em formato de bastões. Barra de escala: A-10 μ m; Destaque de A-1 μ m. Fonte: A autora, 2023.

Em um perfil transversal do ceco com 17 dias de infecção, realizado pela técnica de criofratura, observamos a mucosa intestinal com o parasito, em larva de terceiro estágio, inserido na mucosa, grande quantidade de bactérias baciliformes na superfície da mucosa, Figura 16A. Neste mesmo corte também é possível visualizar outras áreas de ruptura da superfície da mucosa intestinal localizadas próximo ao parasito, também com a presença de bactérias no tecido e aderidas à cutícula do parasito, figura 16A e em detalhe. Na figura 16B, conseguimos visualizar o *T. muris* (L3) penetrando na superfície da mucosa

intestinal também com 17 dias de infecção, onde ele rompe o tecido e se insere. Destaca-se um grande número de bactérias colonizando a superfície da mucosa intestinal. Com 17 dias de infecção, foi possível observar bactérias baciliformes invadindo a submucosa intestinal, que é uma camada mais profunda do ceco, figura 16C, mostrando que o processo de translocação bacteriana já ocorre nesta fase aguda da infecção, detalhado no destaque da figura 16C.

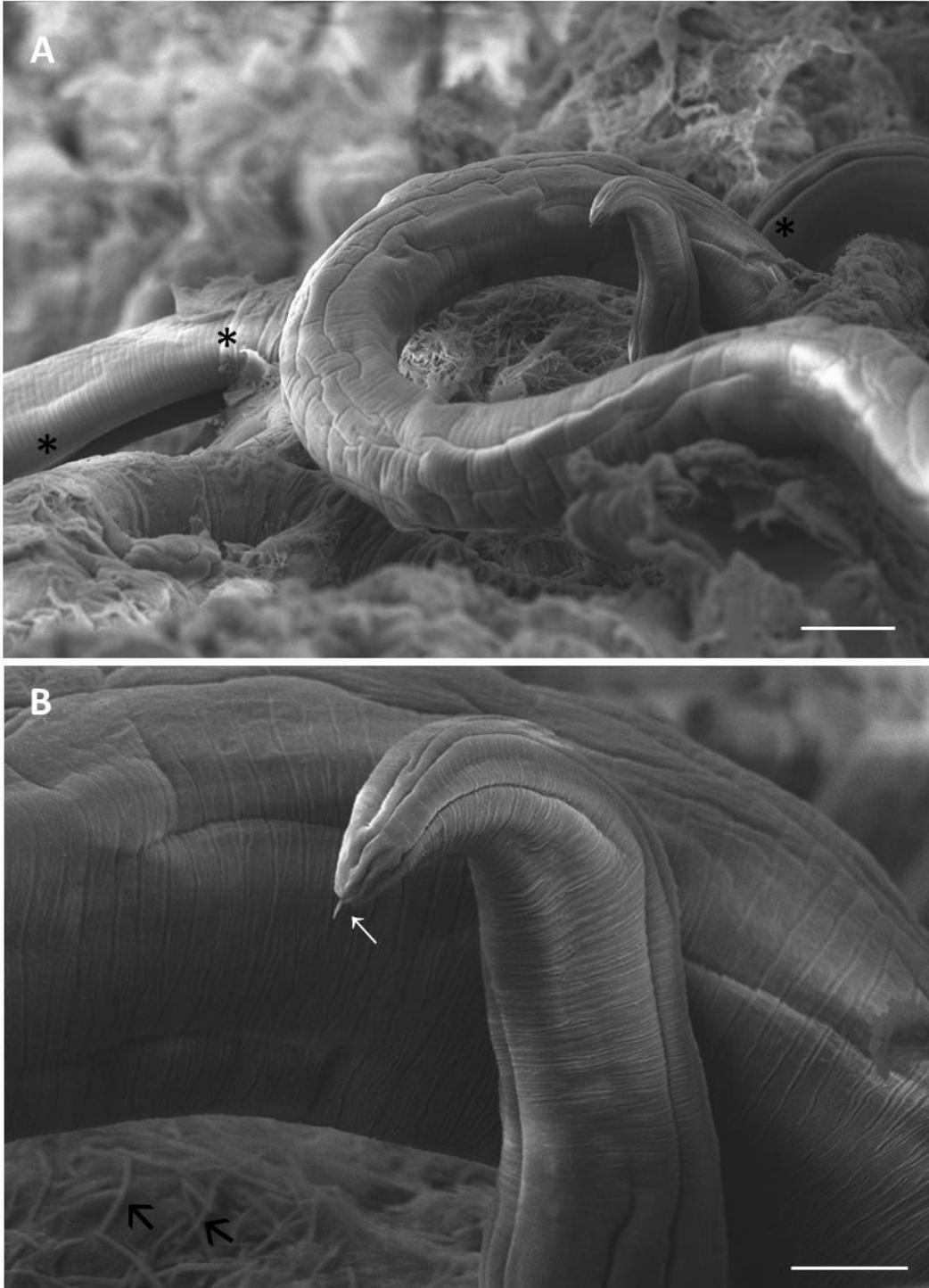
Com 17 dias de infecção conseguimos também flagrar o nematoide *T. muris* se inserindo na mucosa intestinal, se ancorando no tecido por meio de uma escavação lateral através de IECs (células epiteliais intestinais) adjacentes que se juntam para formar uma única estrutura que abriga o parasito, e que o mesmo emerge a sua região anterior em direção a luz intestinal, sugerindo um movimento de penetração pelo tecido, figura 17 A. Na figura 17 B conseguimos visualizar, em detalhe, a região anterior do parasito ao emergir do túnel, e o estilete, estrutura utilizada por estes nematoides para perfurar e penetrar no tecido.

Figura 16. MEV do ceco com o *Trichuris muris* rompendo a mucosa intestinal com 17 dias de infecção e bactérias aderidas.



Legenda: MEV do ceco de camundongos infectados por *Trichuris muris*, com 17 dias de infecção. Figura A – Criofratura do ceco mostrando a mucosa intestinal e o parasito inserido na mucosa, ruptura da mucosa intestinal e bactérias próximas a ruptura. Destaque de A – mostrando em maior aumento o parasito penetrando na mucosa e carregando bactérias presentes na mucosa. Figura B – Parasito inserido na mucosa intestinal com bactérias aderidas em seu corpo e na superfície da mucosa intestinal, e detalhes da cutícula do parasito. Figura C – criofratura do ceco mostrando mucosa e submucosa com presença de bactérias na submucosa, detalhadas no destaque. Mu – Mucosa; * - *T. muris*; Seta branca – parasito rompendo a mucosa intestinal; Seta preta – bactérias em formato de bastonete. Barra de escala: A, B e C – 10µm; Destaque de A – 1µm; Destaque de C – 2µm. Fonte: A autora, 2023.

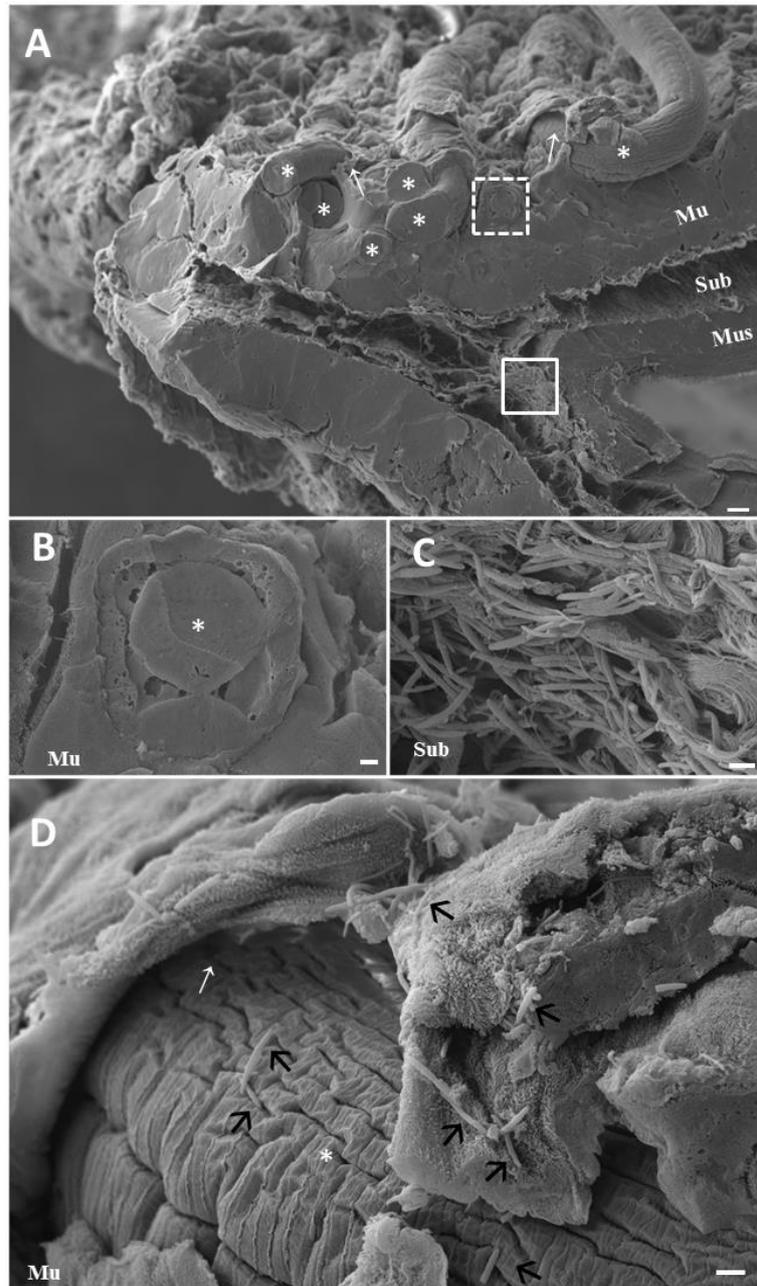
Figura 17. MEV do ceco com o *Trichuris muris* rompendo a mucosa intestinal com 17 dias de infecção, momentos antes de penetrar na mucosa.



Legenda: MEV do ceco de camundongos infectados por *Trichuris muris* com 17 dias de infecção. Figura A – Parasito inserido na mucosa intestinal, rompendo diversas regiões da mesma durante a migração pelo túnel sincicial, e presença de bactérias na superfície da mucosa. Figura B – Presença do parasito na mucosa em maior aumento, momentos antes da penetração na mucosa, detalhes da cutícula do nematoide e estilete, seta branca. Seta preta indicando a presença de bactérias. * - Ruptura da mucosa causada pelo *Trichuris muris*. Barra de escala: A – 30 μ m; B – 10 μ m. Fonte: A autora, 2023.

Com 22 dias de infecção, em nossos resultados obtidos por criofratura e MEV foi possível identificar em perfil transversal do ceco, as três camadas teciduais: mucosa, submucosa e camada muscular, numa região com vários perfis da região anterior do nematoide *T. muris* (L4) inserida na mucosa intestinal, figura 18A. A figura 18B é referente ao detalhe pontilhado da figura 18A, mostrando um corte transversal do verme dentro formando o túnel no tecido hospedeiro. A figura 18C é referente ao detalhe em linha contínua da figura 18A, mostrando uma grande quantidade de estruturas bacterianas já na submucosa intestinal, predominando a presença de bactérias baciliformes. Na figura 18D é possível observar, em maior detalhe, a ruptura da mucosa intestinal promovida pelo parasito, o espaço entre o parasito e o túnel, além de bactérias aderidas à superfície da cutícula. Vale destacar ainda bactérias baciliformes em formato esférico (cocos) aderidas nas microvilosidades da mucosa intestinal, muito próximas da região de inserção/ancoramento do parasito.

Figura 18. MEV do ceco com o *Trichuris muris* rompendo a mucosa intestinal com 22 dias de infecção e bactérias invadindo a submucosa.

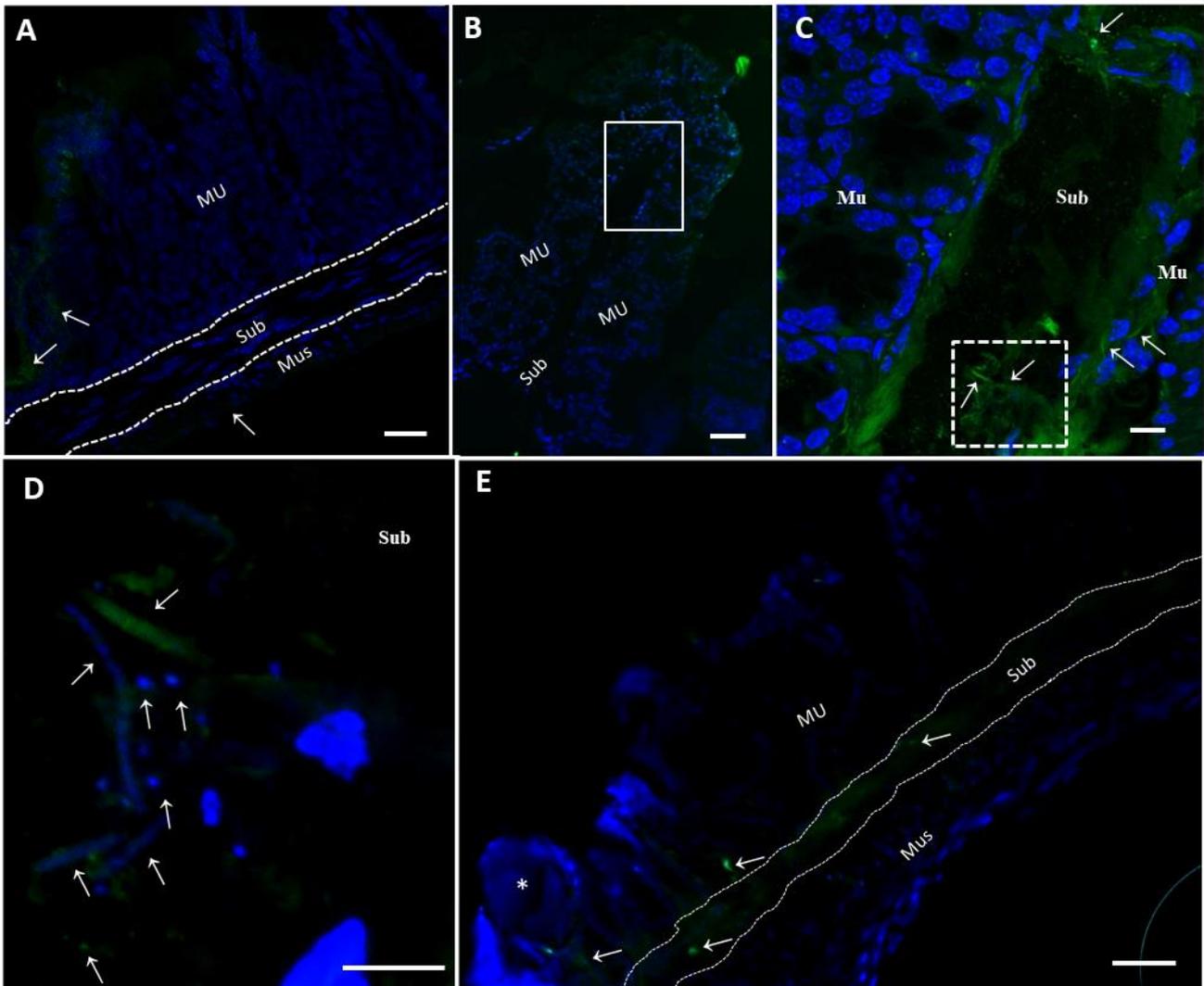


Legenda: MEV do ceco de camundongos infectados com *Trichuris muris* com 22 dias de infecção. Figura A - Criofratura do ceco, mostrando as três camadas do tecido intestinal e o parasito inserido na mucosa, ruptura da mucosa intestinal e bactérias invadindo a submucosa. Figura B - detalhe pontilhado da figura A, mostrando o verme dentro do túnel em um corte transversal. Figura C - detalhe em linha contínua da figura A, mostrando grande quantidade de bactérias em formato de bastonetes invadindo a submucosa intestinal. Figura D - Parasito rompendo a mucosa intestinal com bactérias aderidas em seu corpo e nas microvilosidades a mucosa intestinal. Mu - Mucosa; Sub - Submucosa; Mus - Camada muscular; * - *T. muris*; Seta branca - parasito rompendo a mucosa intestinal; Seta preta - bactérias em formato de bastonete. Barra de escala: A - 20µm; B e D - 3µm; C - 2µm. Fonte: A autora, 2023.

3.9 Mapeamento do processo de translocação por hibridização *in situ*

Após os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura, realizamos a técnica de hibridização *in situ*, a qual utilizamos sondas específicas para a marcação de eubactérias. Em nossos resultados identificamos a presença de bactérias apenas na superfície da mucosa intestinal e no interior das criptas de Lieberkuhn dos animais em grupos controle, o que é de se esperar uma vez que essas regiões estão em contato direto com a microbiota presente no lúmen intestinal, figura 19A. Já nos camundongos infectados, a partir do 17º dia de infecção encontramos bactérias na submucosa intestinal, figura 19B detalhada em maior aumento em 19C. Em nossas imagens foi possível identificar bactérias baciliformes e em formato de cocos na figura 19. Na figura 19E destacamos o parasito inserido na mucosa intestinal e marcações com a sonda e bactérias próximas à região de ancoramento, além de outras marcações em camadas mais profundas da mucosa epitelial e na submucosa. Estes resultados consolidam a hipótese de translocação bacteriana ainda em fase aguda da tricuriase experimental com baixa carga de infecção. Vale destacar que com 17 dias de infecção o nematoide está em seu terceiro estágio larval de desenvolvimento.

Figura 19. FISH do ceco de camundongos controles e infectados por *Trichuris muris*, mostrando bactérias invadindo a partir do 17º dia de infecção.



Legenda: FISH do ceco de camundongo controle e infectados com *Trichuris muris*. Filtro Alexa 488 marcando em verde as bactérias e DAPI em azul, marcando o material genético das células. Figura A – Ceco de camundongo controle com 35 dias, mostrando as três camadas teciduais, com bactérias apenas na mucosa intestinal. Figura B – Ceco do camundongo infectado com 17 dias de infecção, mostrando a mucosa e submucosa intestinal com destaque na submucosa, detalhado em maior aumento na figura C. Figura C - Ceco do camundongo infectado com 17 dias, mostrando bactérias em formato de cocos e bastonetes invadindo a submucosa intestinal, seta indica. Destaque de C é referente a figura D em maior aumento. Figura D – Destaque em maior aumento da figura C, ceco com 17 dias de infecção, mostrando bactérias em formatos de cocos e bastonetes invadindo a submucosa intestinal, seta indica. Figura E – Ceco do camundongo infectado com 22 dias de infecção, com o parasito inserido na mucosa intestinal e bactérias marcadas em verde próximo ao parasito, em outras regiões da mucosa intestinal e ao longo da submucosa intestinal. Mu – Mucosa; Sub – Submucosa; Mus – Camada muscular; Seta - bactérias em formato de cocos e bastonete. Barra de escala: A - 20µm; B - 10µm; C - 5µm; D - 5µm; E - 10µm. Fonte: A autora, 2023.

4 DISCUSSÃO

Sabe-se que nematoides de vida livre e geo-helminthos necessitam de condições ambientais adequadas para o desenvolvimento de parte do seu ciclo biológico, tais como: umidade, pH e temperatura (CHOI, ZHOU, *et al.*, 2020). Fatores climáticos como a alta pluviosidade anual e temperaturas ambientais abaixo de 26 °C estão associados a maiores índices de infecção por *Trichuris trichiura* (SCHOLTE, SCHUR, *et al.*, 2013). Assim como condições externas podem influenciar no parasitismo, a temperatura corporal do hospedeiro também pode interferir nas infecções como uma forma de neutralizar uma possível ameaça ao organismo (BECKER, WU, 2010). Algumas infecções parasitárias podem gerar o aumento da temperatura corporal do hospedeiro (febre) como no caso de algumas infecções causadas por protozoários: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*; nematoides: *Ascaris lumbricoides*; e trematodas: *Fasciola hepática* e *Schistosoma mansoni* (EKPANYAPONG, REDDY, 2020). A aferição da temperatura corporal pode variar de acordo com o tipo de equipamento utilizado para tal finalidade (MEYER, OOTSUKA, *et al.*, 2017). O equipamento que utilizamos para aferir a temperatura dos animais foi um termômetro de infravermelho, onde direcionamos a incidência da luz infravermelha para a superfície da região abdominal dos camundongos imobilizados. Mesmo a febre sendo um dos primeiros sintomas em diversas doenças infecciosas e algumas parasitárias (BOISIER, JAMBOU, *et al.*, 2002; GARCIA-ZAPATA, SOUZA JÚNIOR, 2006; LOMBARD, BASSET, *et al.*, 2018; EKPANYAPONG, REDDY, 2020) ao longo da infecção por *T. muris* observamos que a temperatura corporal dos camundongos C57BL/6 se manteve parcialmente estável em torno de 32°C, variando cerca de 0,53°C no grupo controle e 1,4°C no grupo infectado. Houve um aumento significativo da temperatura corporal somente no 22º dia no grupo infectado, equivalente ao estágio larval L4, próximo à fase crônica da infecção. Mostramos uma variação de temperatura entre camundongos infectados e controle nos períodos referentes às mudas, uma vez que todos os animais foram submetidos às mesmas condições durante a aferição. A média da temperatura corporal que detectamos ao longo da infecção é compatível com o que há descrito na literatura em experimentos que fazem uso do termômetro retal (WENGER, ALKANA, 1984; CARO, HANKENSON, *et al.*, 2013).

A tricuriase em fase crônica, associada ou não a outras parasitoses, pode acarretar em perda de peso no hospedeiro (LUNN PG, NORTHROP-CLEWES, 1993; SALDIVA, SILVEIRA, *et al.*, 1999; KYUNG-SUN *et al.*, 2009; KHUROO, KHUROO, *et al.*, 2010). Uma das possíveis causas da perda de peso seria a devido à má absorção alimentar e falta de apetite acarretando nas baixas taxas de

micronutrientes importantes para o bom funcionamento do organismo como ferro, zinco e vitamina A (OLATUNBOSUN ARINOLA, ABIMBOLA MORENIKEJI, *et al.*, 2015). Outra possível causa para a perda de peso estaria relacionada a alteração na composição da microbiota intestinal, uma vez que a microbiota está associada ao metabolismo de nutrientes do hospedeiro, e ao desenvolvimento do sistema imunológico do mesmo (WU, LI, *et al.*, 2012). Já foi mostrado em trabalhos anteriores, inclusive do nosso grupo, que a tricuriase acarreta alterações causando um desequilíbrio na microbiota intestinal (HOLM, SOROBETEA, *et al.*, 2015; SCHACHTER, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Neste trabalho não observamos redução de peso corporal dos animais infectados em comparação com os controles, mas vale destacar que estamos avaliando uma infecção com baixa carga parasitária. Diante disso, mesmo que em pequenas variações, destacamos que entre o 17º e 22º dia de infecção, período de transição entre fase aguda e início do desenvolvimento da fase crônica, houve uma leve perda de peso dos animais infectados. Este período é quando as larvas estão em processo de muda do estágio L3 para L4. Esta pequena variação não foi observada aos 35 dias pós infecção, momento correspondente a fase crônica da infecção, estabelecimento do verme adulto e completa formação da banda bacilar, que é associada à atividade imunomoduladora, mediada pelos produtos excretados-secretados (ES).

A absorção de água e nutrientes contidos nos alimentos, e parte da resposta imune se dão no intestino delgado e grosso. As células do íleo por exemplo, apresentam genes relacionados a absorção de água e ao metabolismo de lipídios, proteínas, sais biliares, vitaminas A, B₁₂, K e C e no processo metabólico de drogas, enquanto que as do cólon e reto apresentam genes envolvidos na resposta imune (BINDER, REUBEN, 2009). Avaliar o que ocorre no intestino e como se apresentam as fezes presentes no ceco, sítio de preferência dos *Trichuris* spp., nos auxilia a compreender o quanto a tricuriase pode interferir no metabolismo gastrointestinal e fisiologia corporal. Ao analisarmos a quantidade de fezes contida no ceco, observamos uma queda significativa do conteúdo fecal nos animais infectados do 22º ao 35º dia de infecção, período em que larvas L4 estão completando seu desenvolvimento para verme adulto. Neste período, devido a dimensão do nematoide, destaca-se maior rompimento da mucosa intestinal devido o ancoramento e deslocamento do verme na mucosa. Essa diminuição na quantidade de fezes no ceco pode estar relacionada a composição das fezes estarem mais pastosas, ficando menos retidas e ao aumento do peristaltismo e secreção de muco no intestino na tentativa de eliminar o parasito (VARYANI, FLEMING, *et al.*, 2017; YOUSEFI, HAQ, *et al.*, 2021). Este dado destaca que o aumento do peso do ceco não tem relação com o acúmulo de fezes nessa região e que o inchaço proporcionado pelo infiltrado inflamatório pode estar impactando na capacidade de armazenamento de conteúdo deste órgão durante o processo digestivo dos animais infectados. Vale ainda destacar que observamos hipertrofia do órgão, detectado com o aumento na espessura das três camadas, incluindo a camada muscular, além do

enrijecimento do órgão, que pode interferir na funcionalidade do mecanismo peristáltico. Em decorrência da baixa carga parasitária, os camundongos não apresentaram diarreia, mas há casos em que a tricuriase grave ocasiona diarreia, que pode agravar o quadro de impacto funcional do sistema gastrointestinal (LI, LU, *et al.*, 2022). Nesses casos de diarreia, dois fatores podem ser destacados como a causa. O primeiro fator compreende a atuação de uma resposta imunológica mediada por anticorpos IgE específicos associada à degranulação de mastócitos. O segundo fator é decorrente do contato de antígenos do nematoide com células intestinais do hospedeiro, estimulando a secreção de cloreto, o que também pode promover diarreia (AZIRA *et al.*, 2012). Em alguns casos da doença os indivíduos podem apresentar desnutrição proteica, anemia. Além disso, em casos graves o hospedeiro pode apresentar o prolapso retal ou evoluir para a Síndrome da Disenteria de *Trichuris* (TDS), que é uma combinação de sintomas, como a diarreia mucoide e sangramento ocasional (KYUNG-SUN *et al.*, 2009), que podem ter como causa a alteração da microbiota e translocação bacteriana.

Com 10 dias de infecção, já observamos o parasito (L2) inserido na mucosa intestinal, causando lesões que desencadeiam em hiperplasia e hipertrofia da mucosa, submucosa e camada muscular. Os enterócitos possuem importante papel no transporte de substâncias minerais, orgânicas e na absorção de proteínas (BINDER, REUBEN, 2009). As células caliciformes estão relacionadas a secreção de mucinas, que podem dificultar o processo de colonização de microrganismos na superfície do epitélio intestinal (THORNTON, SHEEHAN, 2004; YOUSEFI, HAQ, *et al.*, 2021). Observamos um aumento do número de enterócitos a partir do 10º dia de infecção e das células caliciformes a partir do 17º dia. Em particular, a IL-4 estimula os enterócitos a produzir mucina, enquanto a IL-13 está envolvida na hiperplasia das células caliciformes (DARLAN, ROZI, *et al.*, 2021b; SHARBA, NAVABI, *et al.*, 2019), em nossos dados registramos o aumento de IL-4 no ceco a partir do 10º dia de infecção, dados que sustentam a importância das células caliciformes e dos enterócitos no controle da suscetibilidade e evolução da tricuriase.

A hipertrofia observada na camada muscular a partir do 10º dia de infecção, pode estar relacionada ao aumento do peristaltismo, devido a contração e relaxamento da musculatura na tentativa de eliminar o parasito. No ceco, também observamos o espessamento da mucosa e submucosa intestinal a partir do mesmo período, 10 dias de infecção que é referente a larva de estágio L2, se estendendo até a fase crônica da infecção, que é o período e que encontramos vermes adultos e início da eliminação de ovos junto às fezes do hospedeiro (ELSE, KEISER, *et al.*, 2020). As alterações em espessura observadas na mucosa são consequência, principalmente, do aumento do número de enterócitos (10º dia) e células caliciformes (17º dia). Na submucosa, o papel principal é do infiltrado de células inflamatórias, que também é observado na mucosa. Na mucosa intestinal, observamos um aumento de eosinófilos e neutrófilos, a

partir do 10º dia de infecção, macrófago e linfócitos a partir do 17º dia de infecção. Na medida que a infecção vai se aproximando da fase crônica, e as lesões aumentando, aumenta o número de células inflamatórias nesta região. Na submucosa observamos um aumento de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos a partir do 10 dia de infecção. Esse aumento se mantém até a fase crônica da infecção, com 35 dias. A presença do parasito, a ruptura na mucosa intestinal e o contato íntimo do tecido lesionado com a microbiota intestinal estimula a liberação de alarminas e quimiocinas, que desencadeiam um recrutamento de células inflamatórias para o ceco, sítio da infecção (LEVISON, MCLAUGHLIN, *et al.*, 2010). Conforme a infecção progride, resulta em dano no epitélio do hospedeiro, que responde com a expressão da sinalização de interferon tipo I (IFN), que é uma alarmina capaz de iniciar respostas imunológicas e de reparo tecidual (DUQUE-CORREA, GOULDING, *et al.*, 2022). Em nossos resultados observamos um aumento de IFN- γ no ceco com 10 e 17 dias de infecção e nos linfonodos com 17, 22 e 35 dias, sendo no sítio parasitário uma resposta mais imediata.

Na cavidade abdominal residem macrófagos que, dentre diferentes atribuições, atuam para controlar processos inflamatório sistêmicos, trabalhando para recrutar outras células e moléculas envolvidas em mecanismos inflamatórios ou de reparo, regulando o processo com o objetivo de manter a homeostase, auxiliando na imunidade local (SCHUKFEH, ELYAS, *et al.*, 2021). Estímulos de citocinas de perfil Th1 como IL-2, IL-12, IFN γ e TNF α e TNF β levam à ativação de macrófagos com fenótipo inflamatório clássico (CAMs ou macrófagos M1) com perfil mais de ataque e destruição, já as citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, bem como moléculas regulatórias, como IL-10 e TGF β , ativam macrófagos em direção a um fenótipo alternativo (AAMs ou macrófagos M2), com perfil reparador (MURRAY, WYNN, 2011; PINEDA-TORRA, GAGE, *et al.*, 2015). Ao avaliarmos os macrófagos peritoneais dos camundongos ao longo da tricuriase, observamos um aumento no número dessas células na cavidade abdominal apenas na fase crônica da infecção, com 35 dias, período em os vermes adultos estão estabelecidos e ancorados no intestino, com a translocação de bactérias para submucosa (SCHACHTER, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Porém, registramos que essas células atuam na tricuriase desde a fase aguda. Com 17 dias, período em que a larva está em estágio L3, observamos um aumento significativo na produção de IL-6 e TNF nos macrófagos peritoneais, citocinas de perfil regulador e Th1. Sugerindo que, ao mesmo tempo que o sistema imune do hospedeiro investe no combate às lesões e a invasão bacteriana, quadro evidente na fase crônica, também atua na regulação da resposta, tentando equilibrar e desacelerar os danos. Esse processo persiste com 22 dias de infecção, onde os macrófagos peritoneais associados à infecção, continuam apresentando maior produção de IL-6 e TNF, porém também produzindo IL-10, conhecida como fator inibidor da síntese de citocinas humanas (CSIF), clássica citocina anti-inflamatória. No 35º dia de infecção, segue alta produção de IL-6 e ainda se destaca queda de TNF.

Na fase crônica da tricuriase observamos uma alta produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais, associados a mediação de reações bactericidas e citotóxicas (FLORA FILHO, ZILBERSTEIN, 2000). A elevada produção de NO na fase crônica da infecção (35 dias) nos mostra que esses macrófagos estão ativados com um fenótipo M1 (SHAPOURI-MOGHADDAM, MOHAMMADIAN, *et al.*, 2018), porém a alta produção de IL-6 mostra que há também uma resposta mista, envolvendo não só os impactos em relação à presença do parasito no epitélio intestinal, mas também uma intensa resposta em relação à invasão bacteriana.

Quando observamos as citocinas produzidas no ceco e nos linfonodos, notamos que ocorre uma variação nas citocinas Th1 e Th2, onde as células imunes e teciduais do ceco respondem a infecção primeiro que o linfonodo. No ceco ocorre um aumento de IL-2, IL-17, IL-10 com 17 dias de infecção, e no linfonodo, após o verme adulto se estabelecer (35 dias). IL-4, TNF e IFN- γ aumentam no ceco com 10 e 17 dias de infecção, enquanto no linfonodo, o aumento só aparece com 17 e 22 dias para IL-4, 22 e 35 dias para TNF, e com 17, 22 e 35 para IFN- γ . No período que está relacionado com o desenvolvimento da larva L4 e adultos, o parasito começa a modular a resposta no sítio parasitário por conta do produto de excreção e secreção, que tem relação com a completa formação da banda bacilar, interferindo na microbiota intestinal, translocação bacteriana, momento que a atuação dos linfonodos mesentéricos fica mais evidente (BROSSCHOT, REYNOLDS, 2018; SOROBETEA, SVENSSON-FREJ, *et al.*, 2018).

Esta complexa associação de citocinas de perfil inflamatório e regulatório mostra que, desde os primeiros dias da fase aguda, a resposta imune apresenta-se em perfil misto, como foi observado previamente em fase crônica de infecção com alta carga parasitária (SCHACHTER, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Nestes resultados, trazemos evidências de que o processo de lesão tecidual, resposta aos antígenos do helminto e à translocação bacteriana, já em fase aguda, podem estar influenciando nesta resposta imune de perfil misto já nos primeiros 10 dias de infecção, fase em que a larva L2 está colonizando o tecido.

Além das alterações fisiológicas avaliadas pelo perfil bioquímico de dosagem de citocinas, buscamos avaliar a influência da infecção no perfil celular. Leucócitos presentes no sangue periférico circulam por diferentes tecidos e possuem a capacidade de migrar para os alvos de acordo com os estímulos (citocinas, quimiocinas, leucotrienos e produtos microbianos). Dependendo da quantidade e do perfil destes antígenos, observamos leucocitose (aumento dos leucócitos circulantes no sangue periférico) ou leucopenia (diminuição no número de leucócitos circulantes) (CARRICK, BEGG, 2008). Durante o desenvolvimento da tricuriase em camundongos C57BL/6, diferenciamos e quantificamos os leucócitos por distensões sanguíneas. Com 10 dias de infecção há uma queda significativa dos monócitos circulantes, possivelmente por estarem migrando em direção ao sítio parasitário e linfonodo mesentérico,

local próximo ao sítio parasitário, onde observamos aumento de macrófagos já com 10 dias de infecção. Nota-se que o aumento de macrófagos peritoneais só vai ocorrer em fase crônica, no 35º dia de infecção.

Em relação aos eosinófilos, sabe-se que são células que normalmente se apresentam aumentadas em infecções parasitárias (DARLAN, TALA, et al., 2017). Durante a fase crônica da tricuriase ocorre o recrutamento de eosinófilos para a mucosa gastrointestinal (SCHACHTER, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020), sendo regulado pela citocina IL-5 e pela quimiocina CCL11 (DIXON, BLANCHARD, *et al.*, 2006), porém nem sempre a eosinofilia está presente na tricuriase quando analisada apenas na corrente sanguínea (KYUNG-SUN OK, YOU-SUN KIM et al., 2009). Em nossos resultados observamos eosinofilia no sangue periférico dos camundongos infectados a partir do 10º dia, com 22 e 35 dias de infecção. Estas células também estavam presentes na mucosa e submucosa intestinal dos camundongos infectados, e essa eosinofilia no intestino segue no 17º, 22º até o 35º dia.

Com 22 dias de infecção também observamos uma queda significativa dos linfócitos, e um aumento de basófilo e neutrófilos no sangue periférico. Os basófilos compartilham muitas funções com os mastócitos teciduais, seus grânulos de histamina e fatores quimiostático possuem capacidade de atrair eosinófilos e neutrófilos; os neutrófilos por sua vez possuem capacidade de fagocitar rapidamente partículas, sendo a primeira linha celular de defesa numa infecção (CARRICK, BEGG, 2008). Assim sendo, esse aumento de neutrófilos sugere que, com 22 dias de infecção a presença do parasito, e ou da translocação bacteriana, começa a acionar de forma sistêmica o sistema imune do hospedeiro, notando-se na celularidade do sangue periférico.

Avaliamos que seria importante, além de observar as alterações na distribuição de células imunológicas, também avaliar o que ocorre no maior órgão linfoide secundário do corpo, o baço. Este órgão tem um papel importante na recirculação de linfócitos, além de estar associado a eliminação de partículas antigênicas, microrganismos e enterócitos envelhecidos ou anormais (BRENDOLAN, ROSADO, *et al.*, 2007; STEINIGER, 2015). Durante infecções sistêmicas, os macrófagos esplênicos têm um papel importante agindo na eliminação de bactérias presentes no sangue. Este processo protege o organismo de sepse, além de contribuir na ativação de células B e T na polpa branca (BRENDOLAN, ROSADO, *et al.*, 2007). Sabe-se que durante a tricuriase crônica ocorre a translocação bacteriana para as camadas mais profundas do epitélio intestinal (SCHACHTER, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020), e que apesar do sítio parasitário ser o intestino, a resposta imunológica geradas durante a tricuriase tem consequências sistêmicas (HAYES, Kelly S., GRENCIS, 2021). Visamos avaliar o impacto dos antígenos e citocinas circulantes na tricuriase aguda e crônica, avaliamos a anatomia e histologia do baço.

A partir do 17º dia de infecção até o 35º, ocorre um aumento significativo da polpa branca do baço dos camundongos infectados. O aumento da polpa branca pode ter influenciado no peso e tamanho deste órgão, que se apresenta mais pesado com 22 dias e com tamanho maior no 22º e 35º dia pós infecção. Estas alterações sugerem que as lesões no ceco e os antígenos liberados pela larva L3 (com 17 dias de infecção) e a translocação bacteriana, estimulassem o recrutamento de células do sistema imunológico, ativando os tecidos linfoides do baço e linfonodos mesentéricos, apresentando os antígenos aos linfócitos ativados. Esse recrutamento, associado a presença dessas células na mucosa e submucosa intestinal, pode ser um dos motivos da queda significativa dos linfócitos no sangue periférico já com 22 dias de infecção. Além dessas alterações descritas, observamos o aumento de megacariócitos na polpa vermelha. Os megacariócitos são células que podem ser encontradas nos pulmões ou na polpa vermelha do baço, e estão relacionados a produção de plaquetas, que auxiliam no processo de coagulação e reparo tecidual (BRENDOLAN, ROSADO, *et al.*, 2007; LEFRANÇAIS, ORTIZ-MUÑOZ, *et al.*, 2017). O aumento na quantidade de megacariócitos foi observado apenas na fase crônica (35 dias), o que pode estar relacionado à intensificação das atividades de reparo tecidual no intestino, em decorrência das lesões desencadeadas pelos vermes adultos.

O ovo e a larva de *Trichuris* spp. possuem características antigênicas (PARTHASARATHY, MANSFIELD, 2005; CRUZ, MARCILLA, *et al.*, 2021). Além disso, o próprio parasito libera moléculas, como a proteína TT47, que é capaz de formar poros condutores de íons em camadas lipídicas nas células epiteliais do ceco, permitindo que o parasito invada o tecido e mantenha a região anterior inserida no epitélio formando o túnel sincicial (BETHONY, BROOKER, *et al.*, 2006). O processo de penetração no epitélio intestinal associado às características antigênicas presentes no ovo e na larva explicam o porquê nos estágios iniciais da infecção já observamos uma resposta inflamatória se formando no ceco e o início do recrutamento de eosinófilos observados no sangue periférico com 10 dias de infecção.

DUQUE-CORREA, GOULDING, *et al.*, 2022, mostraram que a larva no estágio L1 permanece totalmente inserida na mucosa, o que eles chamaram de “túneis multi-intracelulares”, mas causando danos mínimos às células do hospedeiro. Estas informações sustentam nossos dados, já que em 90 minutos de infecção, momento de eclosão da L1, não observamos alterações locais e nem sistêmicas. Em nossos resultados de MEV com 10 dias de infecção, já observamos o parasito em estágio L2, rompendo a mucosa intestinal, deixando de estar exclusivamente dentro do túnel por ele formado, e criando um canal de continuidade entre o conteúdo intestinal, repleto de bactérias, e os tecidos subjacentes, áreas isentas de microrganismos em tecidos íntegros. Essa ruptura da mucosa intestinal com 10 dias de infecção já começa a impactar na homeostase do hospedeiro, causando alterações citadas

anteriormente. Com 17 dias de infecção, em nossas análises de MEV, flagramos o *Trichuris muris*, durante seu percurso pelo tecido, sugerindo que o mesmo faça uma emersão da região anterior, saindo da mucosa e voltando a penetrar na mesma. Este processo ocasiona diversos pontos de rupturas na mucosa intestinal, desempenhando um mecanismo de deslocamento/ancoramento descrito anteriormente (O'SULLIVAN, CRUICKSHANK, *et al.*, 2021). Foi mostrado que no processo de ancoramento tecidual o nematoide se move com a região anterior em direção ao lúmen, atingindo áreas mais profundas da mucosa, depois volta para a parte apical da cripta e segue repetindo este movimento. Em decorrência destas lesões, as bactérias presentes na superfície da mucosa invadem a submucosa intestinal, dor forma ativa e passivamente ao serem carregadas aderidas à cutícula do helminto. Este processo passa a estar mais evidente a partir do 17º dia de infecção, e flagradas em maior quantidade na submucosa, a partir do 22º dia de infecção.

Em nossas análises por hibridização *in situ* (FISH), confirmamos o que havíamos visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Explorando as camadas intestinais nos experimentos de FISH associado à microscopia de super-resolução, foi possível identificar bactérias baciliformes e com morfologia de cocos na submucosa intestinal a partir do 17º dia de infecção. A dinâmica da infecção aguda do *T. muris*, seu processo de ancoramento em consonância com o desenvolvimento dos estádios larvares com o sinergismo do processo de translocação bacteriana pôde ser melhor detalhada ao corroborar os dados de imunologia, bioquímica e microscopia. Em nossas análises de FISH das amostras obtidas com 22 dias de infecção, detalhamos a presença de bactérias na submucosa com íntima relação com às áreas de ancoramento do parasito, flagrando marcações da sonda na submucosa muito próximas ao local onde o nematoide está inserido na mucosa epitelial. Este fenômeno mostra que este processo de translocação é gradual e pode usar estes pontos de ancoramento para invasão. Com mais lesões teciduais, grupos de microrganismos são observados em camadas mais profundas dessa mucosa e se espalhando, em grande quantidade, por toda a submucosa. Nossos dados corroboram com o observado anteriormente em fase crônica com infecção em alta carga parasitária (SCHACHTER, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2020) e enriquecem este mapeamento da translocação, mostrando que as bactérias invadem ainda em fase aguda, quando as lesões teciduais são provocadas por larvas L3 (17 dias) e L4 (22 dias).

A invasão bacteriana, iniciada na fase aguda, é associada a presença do parasito inserido no tecido, causa alterações crescentes conforme a larva vai se desenvolvendo e migrando pelo tecido. ELSE, KEISER, *et al.*, 2020 citam que a eficácia do tratamento medicamentoso com anti-helmíntico é muito alta para infecções provocadas por *A. lumbricoides*, porém as chances de cura para infecções provocadas por *T. trichiura* são baixas. Além do comportamento intratecidual do parasito e uma possível atividade de detoxificação das drogas pela banda bacilar, mostra-se importante colocar em evidência nas

estratégias terapêuticas e no processo fisiopatológico todo este processo de translocação bacteriana e os impactos sistêmicos registrados desde o 10º dia de infecção. Tem sido alvo de estudo também do nosso grupo a construção de alternativas terapêuticas para o tratamento da tricuriase que leva em consideração este aspecto, abrindo margem para novas estratégias que possam associar anti-helmínticos com antibióticos no tratamento de parasitos que utilizam o tecido intestinal como nicho parasitário.

CONCLUSÃO

Camundongos C57BL/6 em uma infecção leve, com 50 ovos de *T.muris*, apresentam alterações não só no intestino/ceco, mas alterações imunológicas no sangue periférico, peritônio e órgãos linfoides. Com 10 dias de infecção, a larva L2 já causa ruptura na superfície da mucosa intestinal e já é notável o espessamento da mucosa e submucosa intestinal devido ao infiltrado inflamatório repleto de mononucleares e polimorfonucleares. Mas apenas no 17º dia de infecção, com a larva no estágio L3, e em uma infecção alta carga parasitária (150 ovos), que conseguimos observar bactérias chegando a submucosa intestinal. Ao mesmo tempo, em infecção com baixa carga ocorre um equilíbrio na resposta imunológica, inicialmente no ceco e mais tardia (22º e 35º dia) nos linfonodos mesentéricos, mostrando a capacidade de imunomodulação do produto de ES no sítio parasitário. A tricuriase com baixa carga parasitária interfere em locais longe do sítio parasitário, como o baço, evidentes a partir do momento em que a larva L3 favorece a invasão bacteriana na submucosa, ocasionando o aumento da poupa branca, porém os maiores impactos são observados apenas em fase crônica. Os macrófagos peritoneais também desempenham um papel importante durante a tricuriase, e no combate a invasão bacteriana, uma vez que aumentam a produção de Il-6 e TNF no mesmo período em que evidenciamos bactérias começando a invadir camadas mais profundas do tecido. Esses macrófagos são encontrados em maior quantidade, ativados e ao mesmo tempo também produzindo citocinas regulatórias em fase crônica da infecção, período o qual o verme adulto causa maiores lesões na mucosa e há maior translocação bacteriana, mostrando a sua capacidade de combater a infecção ao mesmo tempo que tenta minimizar os danos.

REFERÊNCIAS

AZIRA, N. M. S., ZEEHAIDA, M. "Severe chronic iron deficiency anaemia secondary to *Trichuris* dysentery syndrome - A case report", **Tropical Biomedicine**, v. 29, n. 4, p. 626–631, 2012.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: Um guia prático**. [S.l.], Artmed Editora, 2009.

Bancroft, A J et al. "The effect of challenge and trickle *Trichuris muris* infections on the polarisation of the immune response." **International journal for parasitology** vol. 31,14 (2001): 1627-37. doi:10.1016/s0020-7519(01)00281-8

BARBOSA, A. da S., PINHEIRO, J. L., DOS SANTOS, C. R., *et al.* "Parasitas gastrointestinais em animais em cativeiro no zoológico do Rio de Janeiro.", **Acta Parasitologica**, 2019. DOI: 10.2478/s11686-019-00145-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.2478/s11686-019-00145-6>.

BECKER, J. H., WU, S. C. "Fever — An Update", v. 100, n. 4, p. 281–290, 2010.

BEER, R. J. S. The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. **Research in Veterinary Science**. [S.l: s.n.]. , 1976

BETHONY, J., BROOKER, S., ALBONICO, M., *et al.* Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**. [S.l: s.n.]. Disponível em: [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(06\)68653-4.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(06)68653-4.pdf). Acesso em: 13 out. 2017. , 2006

BINDER, H. J., REUBEN, A. "Nutrient Digestion and Absorption", **Medical Physiology**, p. 949–979, 2009. DOI: 10.1016/b978-1-4160-3115-4.50048-2.

BOISIER, P., JAMBOU, R., RAHARIMALALA, L., *et al.* "Relationship between parasite density and fever risk in a community exposed to a low level of malaria transmission in Madagascar highlands", **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 2 SUPPL., p. 137–140, 1 ago. 2002. DOI: 10.4269/ajtmh.2002.67.137. Disponível em:

<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/67/2/article-p137.xml>. Acesso em: 8 fev. 2023.

BRENDOLAN, A., ROSADO, M. M., CARSETTI, R., *et al.* "Development and function of the mammalian spleen", **InterScience**, p. 166–177, 2007. DOI: 10.1002/bies.20528.

BROSSCHOT, T. P., REYNOLDS, L. A. "The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity", 2018. DOI: 10.1038/s41385-018-0008-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0008-5>. Acesso em: 11 jun. 2019.

CARO, A. C., HANKENSON, F. C., MARX, J. O. "Comparison of thermoregulatory devices used during anesthesia of C57BL/6 mice and correlations between body temperature and physiologic parameters", **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 5, p. 577–583, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24041214/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

CARRICK, J. B., BEGG, A. P. "Peripheral Blood Leukocytes", **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 24, n. 2, p. 239–259, 2008. DOI: 10.1016/j.cveq.2008.05.003.

CHOI, J., ZHOU, H., LANDIG, R., *et al.* "Probing and manipulating embryogenesis via nanoscale thermometry and temperature control", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 26, p. 14636–14641, 2020. DOI: 10.1073/pnas.1922730117.

CRUZ, K., MARCILLA, A., KELLY, P., *et al.* "Trichuris trichiura egg extract proteome reveals potential diagnostic targets and immunomodulators", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, 1 mar. 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009221. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8021180/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811180/). Acesso em: 23 fev. 2022.

D'ELIA, R., DESCHOOLMEESTER, M. L., ZEEF, L. A. H., *et al.* "Expulsion of *Trichuris muris* is associated with increased expression of angiogenin 4 in the gut and increased acidity of mucins within the goblet cell.", **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 492, 2009. DOI: 10.1186/1471-2164-10-492. Disponível em: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-492>.

DARLAN, D. M., ROZI, M. F., YULFI, H. Overview of immunological responses and immunomodulation properties of *Trichuris* sp.: Prospects for better understanding human trichuriasis.

Life. [S.l.], **Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)**. Disponível em: /pmc/articles/PMC7997218/. Acesso em: 3 ago. 2021b. 2021.

DARLAN, D. M., TALA, Z. Z., AMANTA, C., *et al.* "Correlation between soil transmitted helminth infection and eosinophil levels among primary school children in Medan", **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 142–146, 4 abr. 2017. DOI: 10.3889/oamjms.2017.014. Disponível em: /pmc/articles/PMC5420764/. Acesso em: 19 fev. 2023.

DIXON, H., BLANCHARD, C., DESCHOOLMEESTER, M. L., *et al.* "The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection", **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1753–1763, 2006. DOI: 10.1002/eji.200535492.

DUQUE-CORREA, M. A., GOULDING, D., RODGERS, F. H., *et al.* "Defining the early stages of intestinal colonisation by whipworms", **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-29334-0.

EKPANYAPONG, S., REDDY, K. R. "Fungal and Parasitic Infections of the Liver", **Gastroenterology clinics of North America**, v. 49, n. 2, p. 379–410, 2020. DOI: 10.1016/j.gtc.2020.01.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.009>.

ELSE, K. J., KEISER, J., HOLLAND, C. V., *et al.* Whipworm and roundworm infections. **Nature Reviews Disease Primers**. [S.l.], Nature Research. , 1 dez. 2020.

ENDARA, P., VACA, M., CHICO, M. E., *et al.* "Long-term periodic anthelmintic treatments are associated with increased allergen skin reactivity", **Clinical and Experimental Allergy**, v. 40, n. 11, p. 1669–1677, nov. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2010.03559.x.

FAHMY, M. A. M. "An investigation on the life cycle of *Trichuris muris*", **Parasitology**, v. 44, n. 1–2, p. 50–57, 1954. DOI: 10.1017/S003118200001876X.

FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. "Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and functions", **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**,

v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000. DOI: 10.1590/s0104-42302000000300012.

GALHARDO-DEMARCHI, I., MIORANZA, S. D. L., TEIXEIRA, J. J. V., *et al.* "Acompanhamento farmacoterapêutico e frequência de efeitos adversos no uso de antiparasitários na atenção primária a saúde, Sudoeste do Paraná, Brasil", **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 617–621, 2009.

GARCIA-ZAPATA, M. T. A., SOUZA JÚNIOR, E. S. de. "Aspectos fisiopatológicos da febre nas doenças infecto-parasitárias", **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1, p. 111–117, 2006. DOI: 10.5102/ucs.v4i1.26.

GEHART, H., CLEVERS, H. "Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells", **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 1, p. 19–34, 2019. DOI: 10.1038/s41575-018-0081-y. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>.

GRENCIS, R. K., HUMPHREYS, N. E., BANCROFT, A. J. **Immunity to gastrointestinal nematodes: Mechanisms and myths. Immunological Reviews.** [S.l.], Immunol Rev. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24942690/>. Acesso em: 8 fev. 2023., 2014.

HAYES, K. S., BANCROFT, A. J., GOLDRICK, M., *et al.* "Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*", **Science**, v. 328, n. 5984, p. 1391–1394, 6 jun. 2010. DOI: 10.1126/science.1187703. Disponível em: </pmc/articles/PMC3428897/>. Acesso em: 28 maio 2023.

HAYES, Kelly S., CLIFFE, L. J., BANCROFT, A. J., *et al.* "Chronic *Trichuris muris* infection causes neoplastic change in the intestine and exacerbates tumour formation in APC min/+ mice", **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, 26 jun. 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005708.

HAYES, Kelly S., GRENCIS, R. K. "*Trichuris muris* and comorbidities-within a mouse model context", **Parasitology**, v. 148, n. 14, p. 1774–1782, 2021. DOI: 10.1017/S0031182021000883.

HOLM, J. B., SOROBETEA, D., KIILERICH, P., *et al.* "Chronic *Trichuris muris* infection decreases diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of lactobacilli", **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 5 de maio 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0125495. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25942314/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

HOTEZ, P. J., BRINDLEY, P. J., BETHONY, J. M., *et al.* "Helminth infections: The great neglected tropical diseases", **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1311–1321, 1 abr. 2008. DOI: 10.1172/JCI34261.

HOULDEN, A., HAYES, K. S., BANCROFT, A. J., *et al.* "Chronic *Trichuris muris* Infection in C57BL/6 Mice Causes Significant Changes in Host Microbiota and Metabolome: Effects Reversed by Pathogen Clearance", **PloS one**, v. 10, n. 5, 4 maio 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0125945. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25938477/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

HURST, R. J M, ELSE, K. J. "The retinoic acid-producing capacity of gut dendritic cells and macrophages is reduced during persistent *T. muris* infection", **Parasite Immunology**, v. 35, n. 7–8, p. 229–233, 2013. DOI: 10.1111/pim.12032.

HURST, Rebecca J M, ELSE, K. J. "*Trichuris muris* research revisited: a journey through time.", **Parasitology**, v. 140, n. 11, p. 1325–39, 2013. DOI: 10.1017/S0031182013001054. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965819> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3761323>.

KHURROO, M. S., KHURROO, M. S., KHURROO, N. S. "*Trichuris* dysentery syndrome: a common cause of chronic iron deficiency anemia in adults in an endemic area (with videos)", **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 71, n. 1, p. 200–204, 2010. DOI: 10.1016/j.gie.2009.08.002.

KLEMENTOWICZ E., J., TRAVIS A., M., GRENCIS K., R. "*Trichuris muris*: A model of gastrointestinal parasite infection", **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 815–828, 2012. DOI: 10.1007/s00281-012-0348-2.

KOGIEN, M., TEIXEIRA, C. "Mebendazol no tratamento de helmintíases intestinais – revisão de literatura e considerações de Enfermagem", p. 233–245, 2011. .

KOYAMA, K., ITO, Y. "Mucosal mast cell responses are not required for protection against infection with the murine nematode parasite *Trichuris muris*", **Parasite Immunology**, v. 22, n. 1, p. 13–20, 2000.

DOI: 10.1046/j.1365-3024.2000.00265.x.

KYUNG-SUN OK, YOU-SUN KIM, JUNG-HOON SONG, JIN-HO LEE, SOO-HYUNG RYU, JUNG-HWAN LEE, JEONG-SEOP MOON, DONG-HEE WHANG, H.-K. L. "*Trichuris trichiura* Infection Diagnosed by Colonoscopy: Case Reports and Review of Literature", **Korean J Parasitol**, v. 47, n. 3, p. 275–280, 2009. DOI: 10.3347/kjp.2009.47.3.275. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735694/pdf/kjp-47-275.pdf>. Acesso em: 31 maio 2017.

LEFRANÇAIS, E., ORTIZ-MUÑOZ, G., CAUDRILLIER, A., *et al.* "The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors", **Nature**, v. 544, n. 7648, p. 105–109, 2017. DOI: 10.1038/nature21706. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21706>.

LEVISON, S. E., MCLAUGHLIN, J. T., ZEEF, L. A. H., *et al.* "Colonic transcriptional profiling in resistance and susceptibility to trichuriasis: Phenotyping a chronic colitis and lessons for iatrogenic helminthosis", **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 12, p. 2065–2079, 2010. DOI: 10.1002/ibd.21326. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20687192/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

LEROUX, L. P., NASR, M., VALANPARAMBIL, R., *et al.* "Analysis of the *Trichuris suis* excretory/secretory proteins as a function of life cycle stage and their immunomodulatory properties", **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-34174-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30374177/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

LEVISON, S. E., MCLAUGHLIN, J. T., ZEEF, L. A. H., *et al.* "Colonic transcriptional profiling in resistance and susceptibility to trichuriasis: Phenotyping a chronic colitis and lessons for iatrogenic helminthosis", **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 12, p. 2065–2079, 2010. DOI: 10.1002/ibd.21326. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20687192/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

LINDEN, S. K., SUTTON, P., KARLSSON, N. G., *et al.* Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**. [S.l:s.n.]. Disponível em: <https://www.nature.com/mi/journal/v1/n3/pdf/mi20085a.pdf>. Acesso em: 30 maio 2017.

LI, Y., LU, C., HU, H., *et al.* "Chronic diarrhea associated with trichuriasis in a 2-year-old boy", **Pediatrics International**, v. 64, n. 1, p. 1–2, 2022. DOI: 10.1111/ped.15301.

LOMBARD, F., BASSET, D., CAMBONIE, G., *et al.* "Pediatric angiostrongyliasis [L'angiostrongylose en pédiatrie]", **Medecine et Sante Tropicales**, v. 28, n. 1, p. 76–81, 2018. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85046550893&doi=10.1684%2Fmst.2018.0756&partnerID=40&md5=458cbfd4a33b1fc2320f939b4356bd9c>.

LOPES-TORRES, E. J., GIRARD-DIAS, W., DE SOUZA, W., *et al.* "On the structural organization of the bacillary band of *Trichuris muris* under cryopreparation protocols and three-dimensional electron microscopy", **Journal of Structural Biology**, v. 212, n. 2, p. 107611, 1 nov. 2020. DOI: 10.1016/j.jsb.2020.107611.

LOPES TORRES, E. J., DE SOUZA, W., MIRANDA, K. "Comparative analysis of *Trichuris muris* surface using conventional, low vacuum, environmental and field emission scanning electron microscopy", **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 196, p. 409–416, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.026>. Acesso em: 19 maio 2017.

LUNN PG, NORTHROP-CLEWES, C. A. "The impact of gas~rointestinal parasites on protein-energy malnutrition", **Proceedings of the Nutritipn Society**, v. 52, p. 101–111, 1993. .

MARILLIER, R. G., MICHELS, C., SMITH, E. M., *et al.* "IL-4/IL-13 independent goblet cell hyperplasia in experimental helminth infections", **BMC Immunology**, v. 9, n. 1, p. 11, 2008. DOI: 10.1186/1471-2172-9-11. Disponível em: <http://bmcimmunol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2172-9-11>.

MÄRKL, B. "Stage migration vs immunology: The lymph node count story in colon cancer", **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 43, p. 12218–12233, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i43.12218. .

MEBIUS, R. E., KRAAL, G. "Structure and function of the spleen", **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. August,

p. 606–616, 2005. DOI: 10.1038/nri1669.

MEYER, C. W., OOTSUKA, Y., ROMANOVSKY, A. A. "Body Temperature Measurements for Metabolic Phenotyping in Mice", **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. July, p. 1–13, 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00520.

MILLS, J. N. "Lymph node cytology.", **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 19, n. 4, p. 697–717, 1989. DOI: 10.1016/S0195-5616(89)50079-2.

MURRAY, P. J., WYNN, T. A. "Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization", **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 4, p. 557–563, 2011. DOI: 10.1189/jlb.0710409.

NEJSUM, P., ANDERSEN, K. L., ANDERSEN, S. D., *et al.* "Mebendazole treatment persistently alters the size profile and morphology of *Trichuris trichiura* eggs", **Acta Tropica**, v. 204, p. 105347, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105347. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X19308733>. Acesso em: 29 jan. 2020.

OLATUNBOSUN ARINOLA, G., ABIMBOLA MORENIKEJI, O., SANJO AKINWANDE, K., *et al.* "Serum Micronutrients in Helminth-infected Pregnant Women and Children: Suggestions for Differential Supplementation During Anti-helminthic Treatment". **Ann Glob Health**. 2015. DOI: 10.1016/j.aogh.2015.10.001. Disponível em: [http://www.annalsoglobalhealth.org/article/S2214-9996\(15\)01261-8/pdf](http://www.annalsoglobalhealth.org/article/S2214-9996(15)01261-8/pdf). Acesso em: 1 maio 2017.

OMS. **Geohelmintíase**. 2022. 10 de janeiro de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections>. Acesso em: 30 jun. 2022.

OMS. "Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases.", **Organização Mundial de Saúde**, p. 270, 2017.

OMS. Helminthiasis transmitidas por el suelo. 2020. **WHO**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/>. Acesso em: 8 ago. 2020.

OPAS. "Diretrizes: quimioterapia preventiva para o controle de infecções por helmintos transmitidos

pelo contato com o solo em grupos de risco", **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2018.

O'SULLIVAN, J. D. B., CRUICKSHANK, S. M., WITHERS, P. J., *et al.* "Morphological variability in the mucosal attachment site of *Trichuris muris* revealed by X-ray microcomputed tomography", **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 10, p. 797–807, 1 set. 2021. DOI: 10.1016/J.IJPARA.2021.04.006.

PARTHASARATHY, G., MANSFIELD, L. S. "*Trichuris suis* excretory secretory products (ESP) elicit interleukin-6 (IL-6) and IL-10 secretion from intestinal epithelial cells (IPEC-1)", **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 3–4, p. 317–324, 10 ago. 2005. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.03.043. .

PHOSUK, I., SANPOOL, O., THANCHOMNANG, T., *et al.* "Molecular identification of *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* eggs in human populations from Thailand, Lao PDR, and Myanmar", **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 39–44, 2018. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0651. Disponível em: /pmc/articles/PMC5928743/. Acesso em: 23 fev. 2022.

RICHARD, M., GRENCIS, R. K., HUMPHREYS, N. E., *et al.* "Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris* infected mice.", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 2, p. 767–772, 2000. DOI: 10.1073/pnas.97.2.767.

SALDIVA, S. R., SILVEIRA, A. S., PHILIPPI, S. T. "*Ascaris Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children", **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 13, p. 89–98, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-3016.1999.00145.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9987788/>.

SCHACHTER, J., DE OLIVEIRA, D. A., DA SILVA, C. M., *et al.* "Whipworm infection promotes bacterial invasion, intestinal microbiota imbalance, and cellular immunomodulation", **Infection and Immunity**, v. 88, n. 3, 1 mar. 2020. DOI: 10.1128/IAI.00642-19. Disponível em: /pmc/articles/PMC7035941/. Acesso em: 3 ago. 2021.

SCHOLTE, R. G. C., SCHUR, N., BAVIA, M. E., *et al.* "Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminth infections in Brazil, using Bayesian geostatistical models", **Geospatial Health**, v. 8, n. 1, p. 97–110, 2013. DOI: 10.4081/gh.2013.58.

SCHUKFEH, N., ELYAS, A., VIEMANN, D., *et al.* "Phenotypic Switch of Human Peritoneal Macrophages during Childhood", **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 31, n. 1, p. 86–94, 2021. DOI: 10.1055/s-0040-1717088.

SCZESNY-MORAES, EURICO A; BIANCHIN, IVO; DA SILVA, K. F., CATTO, J. B., HONER, M. R., *et al.* "Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul", **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 229–236, 2010. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000300007.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol.** 2018 Set;233(9):6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429. Epub 2018 março 1.

SHARBA, S., NAVABI, N., PADRA, M., *et al.* "Interleukin 4 induces rapid mucin transport, increases mucus thickness and quality and decreases colitis and *Citrobacter rodentium* in contact with epithelial cells", **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 97–117, 1 jan. 2019. DOI: 10.1080/21505594.2019.1573050. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6363059/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/336363059/). Acesso em: 27 fev. 2023.

SOROBETEA, D., SVENSSON-FREJ, M., GRENCIS, R. "Immunity to gastrointestinal nematode infections", **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 2, p. 304–315, 2018. DOI: 10.1038/mi.2017.113. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2017.113>.

STEINIGER, B. S. "Human spleen microanatomy: why mice do not suffice", **Immunology**, v. 145, p. 334–346, 2015. DOI: 10.1111/imm.12469.

TAKAHASHI, M., WAKABAYASHI, K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Science**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03235.x>. Acesso em: 6 dez. 2020. Jun. 2004.

THORNTON, D. J., SHEEHAN, J. K. "From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier.", **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, n. 1, p. 54–61, 2004. DOI: 10.1513/pats.2306016. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1513/pats.2306016>.

Acesso em: 30 maio 2017.

TILNEY, L. G., CONNELLY, P. S., GUILD, G. M., *et al.* "Adaptation of a nematode parasite to living within the mammalian epithelium", **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v. 303, n. 11, p. 927–945, 2005. DOI: 10.1002/jez.a.214.

VARYANI, F., FLEMING, J. O., MAIZELS, R. M. Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. [S.l.], **American Physiological Society**. 1 jun. 2017.

WENGER, J. R., ALKANA, R. L. "Temperature dependence of ethanol depression in C57BL/6 and BALB/c mice", **Alcohol**, v. 1, n. 4, p. 297–303, 1984. DOI: 10.1016/0741-8329(84)90052-1.

WILLARD-MACK, C. L. "Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes", **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 409–424, 2006. DOI: 10.1080/01926230600867727.

WU, S., LI, R. W., LI, W., *et al.* "Worm Burden-dependent disruption of the porcine colon microbiota by *Trichuris suis* infection", **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035470.

YAO, C., WALKUSH, J., SHIM, D., *et al.* "Molecular species identification of *Trichuris trichiura* in African green monkey on St. Kitts, West Indies", **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 11, n. December 2016, p. 22–26, 2018. DOI: 10.1016/j.vprsr.2017.11.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.11.004>.

YOUSEFI, Y., HAQ, S., BANSKOTA, S., *et al.* "*Trichuris muris* model: Role in understanding intestinal immune response, inflammation and host defense", **Pathogens**, v. 10, n. 8, 22 jul. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10080925. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34451389>. Acesso em: 23 fev. 2022.

ANEXO A - Aprovação da comissão de ética


**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)**


Certificamos que a proposta intitulada "**Alterações sistêmicas em camundongos C57BL6, infectados por Trichuris muris como modelo de estudo para a trichuriose humana e veterinária e a interação com bactérias na fase aguda e crônica da infecção**", registrada com o nº 059/2018, sob a responsabilidade de **Eduardo José Lopes Torres** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 27/11/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/11/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL6
Nº de animais	120
Peso/Idade	15 g / 4 a 6 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 27 de Novembro de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ